

薬剤と受容体の相互作用機構の解析 方法と新規薬剤検索システムの開発

2003 年 3 月

佐賀大学大学院工学系研究科
エネルギー物質科学専攻

澁江 光邦

目 次

要 旨	-----	1
第 1 章 序論	-----	4
1-1.	はじめに	5
1-2.	薬剤の開発	7
1-2-1.	薬剤	7
1-2-2.	新薬開発	8
1-3.	G タンパク共役型受容体 (GPCR)	11
1-3-1.	G タンパク共役型受容体とは	11
1-3-2.	GPCR の分類	14
1-3-3.	GPCR に結合する内因性リガンド	14
1-3-4.	GPCR の重要性	14
1-3-5.	オーファン受容体	19
1-4.	ホルミルペプチド受容体 (FPR)	22
1-4-1.	好中球	22
1-4-2.	FPR ファミリー	25
1-4-3.	FPR のシグナル伝達	26
1-5.	参考文献	35
第 2 章	ホルミルペプチドアナログのデザインと合成	39
2-1.	構造活性相関	40
2-2.	光アフィニティー標識	47
2-3.	fMLP アナログのデザイン	54
2-4.	固相法によるペプチドの合成	57
2-5.	参考文献	63

第 3 章	fMLP アナログの生理活性と受容体の光架橋----	67
3-1.	血球分離	68
3-2.	遊走活性	69
3-3.	活性酸素産生	72
3-4.	光架橋実験	75
3-4-1.	Cross-linking	75
3-4-2.	Protein Assay	78
3-4-3.	SDS-PAGE	82
3-4-4.	Western Blotting	84
3-5.	参考文献	89
第 4 章	マイクロリアクター -----	90
4-1.	マイクロチップ技術	91
4-2.	マイクロリアクター	95
4-2-1.	マイクロリアクターとは	95
4-2-2.	マイクロリアクターの特徴	95
4-2-3.	マイクロリアクターの作製方法	97
4-3.	マイクロリアクターの作製と評価	101
4-4.	参考文献	108
第 5 章	マイクロリアクターを用いた受容体の活性化 --	110
5-1.	リアクター反応のデザイン	111
5-1-1.	FPR の活性化	111
5-1-2.	カルシウム蛍光プローブの選択	111
5-2.	fMLP 刺激による FPR の活性化	118
5-3.	アンタゴニストによる活性化の阻害	127
5-3-1.	fMLP のアンタゴニスト	127
5-3-2.	バッチ反応	127
5-3-3.	マイクロリアクター反応	133
5-4.	参考文献	137

第 6 章	まとめ	139
6-1.	薬剤と受容体の相互作用機構の解析方法	140
6-2.	薬剤の検索装置の開発	144
6-3.	まとめ	146
6-4.	参考文献	148
略号・付録		149
謝 辞		154

要旨

近年のゲノム解析の結果、我々の前には莫大な量のヒトの遺伝子配列など多くの情報が明らかとなった。これらの情報の中でも細胞外からの情報を細胞内に伝達する機能を有する受容体タンパク質の遺伝子が比較的多く、数千個の遺伝子が存在していることが明らかとなった。この細胞内外の情報伝達に関与しているものに G タンパク質共役型受容体と呼ばれる一群の受容体タンパク質がある。この G タンパク質共役型受容体は生体機能の調節に重要な役割を果たしており、しばしば疾患にも深く関わっているため、創薬の重要なターゲットとされてきた。これらの受容体タンパク質をターゲットにして薬剤を開発する上で重要なことは、薬剤と標的タンパク質がどのように結合し、どのような機能を有するかを明らかにすることと、効率的な評価システムが存在するかの 2 点だと考えられる。そこで本研究では、薬剤と標的受容体の相互作用機構の解析方法を検討するため、G タンパク質共役型受容体の一つであり、生体防御機能を有するホルミルペプチド受容体 (FPR) を標的に、一連の fMLP アナログを用いて生理活性測定、光架橋反応による標的受容体の検出を行い、また、マイクロチップ技術を応用し受容体の活性化を検討することで、簡便な薬剤検索システムの開発を目指して研究を行った。

デザインしたペプチド中には光アフィニティーラベルとして Bpa 残基を導入し、また、アビジンを用いたウェスタンブロット法で検出する際のタグとしてビオチン残基を導入し、固相法によってペプチドの合成を行った。これらの合成した fMLP アナログを用いて、生理活性を測定した結果、Ahx スペーサーの短い $[Bpa^4, Ahx_0]$ -fMLP、 $[Bpa^4, Ahx_1]$ -fMLP アナログでは、遊走活性、活性酸素産生能を示さなかった。また、光アフィニティープローブである Bpa の位置を変

化させた[Bpa⁴,Ahx₂]-fMLP、[Bpa²,Ahx₂]-fMLP アナログにおいて、4 位に Bpa を導入した[Bpa⁴,Ahx₂]-fMLP は遊走活性、活性酸素産生能の両方の活性を示した。一方、2 位に導入した[Bpa²,Ahx₂]-fMLP は活性酸素産生能のみ示した。これらの結果から、本研究で用いた一連の fMLP アナログを用いる FPR の活性発現には少なくとも 2 つの Ahx スペースが必要であり、2 位の位置にかさ高い Bpa 残基を導入することによって、どの生理活性を示すかを選択できる可能性を持つことが示唆された。

UV 照射による光架橋された FPR の検出を行った光架橋実験では、生理活性を示さなかった[Bpa⁴,Ahx₀]-fMLP、[Bpa⁴,Ahx₁]-fMLP は FPR との複合体を形成せず、FPR のバンドは検出できなかった。一方、Bpa 残基の位置を変化させた[Bpa⁴,Ahx₂]-fMLP、[Bpa²,Ahx₂]-fMLP は FPR との複合体のバンドが検出され、このバンドは光架橋の際、fMLP を共存させるとその濃度に依存してバンドの濃さ(光架橋された FPR 量)が変化するという結果が得られた。これらの結果から、ビオチンとアビジンの相互作用を利用した光架橋された FPR の検出は、生理活性を有し、適切な標識を行ったアナログを用いることによって、標的受容体の検出を行えることが示された。このようにビオチンとアビジンの相互作用システムと、Bpa 残基などの光アフィニティーラベルを用いた光架橋実験と組み合わせることは、薬物 - 標的受容体の相互作用形式を解明するための有用な手法となることが示された。

次いで、簡便な薬剤検索システムの開発としてマイクロチップ技術を応用し、FPR の活性化について検討した。これらの結果、好中球と緩衝液の混合部が短い Flow 1 chip、Flow 2 chip では全く FPR の活性化が引き起こされず、好中球と緩衝液の混合部が短く、流路幅、深さが小さい Flow 3 chip では、受容体の活性化が引き起こされ、さらに、市販の阻害剤である Boc-Nle-Leu-Phe を用いた阻害実験では低濃度で fMLP 刺激による活性化が阻害でき、この結果はマイクロ流路特有の現象である可能性が考えられた。今回用いた Flow 3 chip にはまだ無駄な部分があるため、マイクロリアクターの最適化を行えば、

測定時間の短縮、測定に用いるサンプルや廃液量の更なる微少化、ひいては実験にかかるコストの減少につながると考えられる。以上のことから、本研究では従来から存在する高価で大型な装置を用いる必要のない、小型で安価で迅速に薬剤のスクリーニングに応用できる装置の開発に成功した。

これらの研究成果は、製薬業界に求められている低コストで、多種類微量な薬剤候補化合物から薬剤を開発するハイスループット技術に大いに貢献でき、新薬の開発に大きな知見をもたらすと期待される。

第1章

Introduction

序 論

1-1. はじめに

21 世紀を担う科学技術はバイオテクノロジー、IT、ナノテクノロジーであろう。バイオテクノロジーといってもその範囲は広く、生分解性プラスチックなどの生化学的製品から、遺伝子組み換え作物、医療分野へと多岐にわたる。これらの技術は 21 世紀の産業や日々の生活に深く関わっており、そのあり方を大きく変えると期待されている。このようなバイオの技術は 20 世紀での大半を費やして行われた基礎研究の上に成り立っている。方法論としてはひたすらミクロの世界に深く入り、これ以上分解不可能だという状態まで持っていく、その姿を突き止めるというものであった。その際たるものが生命の設計図であるゲノムであろう。

我々ヒトのゲノムの解析は 1990 年、日米英仏独中の 6 カ国が参加する国際共同チームの「ヒトゲノムプロジェクト」に端を発し、その後、米 Celera Genomics 社の成果などによって、2000 年 6 月 26 日にヒトゲノム外観の読みとり完了が宣言された。これらの研究成果によって、我々の前には莫大な量のヒトの遺伝子配列が明らかとなった[1]。これらの情報の中でも細胞外からの情報を細胞内に伝達する機能を有する受容体タンパク質の遺伝子が比較的多く、数千個の遺伝子が存在していることが明らかとなった。この遺伝子から推定されるタンパク質の大半は未だに、結合することでタンパク質の機能発現に関与する化合物が未知であり、その機能も未解明のままである。

これらの結合する化合物や機能が未知の受容体タンパク質はオーファン受容体と呼ばれ、生理的に重要な発見につながる可能性を秘め、また、新規な薬剤を開発するターゲットになりうると期待されている。そのため、世界中の研究者や多くの製薬企業はこの受容体タンパク質を標的に研究を行い、ヒトの味覚や嗅覚、感情といった高次機能の解明や新規薬剤の発見を目指している。

これらの受容体タンパク質をターゲットにして薬剤を開発する上で重要なことは、薬剤と標的タンパク質がどのように結合し、どのような機能を有するかを明らかにすることと、効率的な評価システムが存在するかの2点だと考えられる。そこで本研究では、薬剤と標的受容体の相互作用機構の解析方法検討し、簡便な薬剤検索システムの開発を目指して研究を行った。

1-2. 薬剤の開発

1-2-1. 薬剤

我々、ヒトはこの世に生まれてきたときから、様々な外敵である細菌や微生物にさらされ、これらの異物から自己を守って生きている。本来、これらの外敵から身を守るための防御機能や生体の恒常性を維持する機能がヒトには備わっている。しかしながら、現代では不規則な生活や、乱れた食生活による生活習慣病や、ストレスや老化による防御機能の低下による疾患が引き起こされている。また、これらの後天的な疾患の他にも、遺伝による先天的な疾患もあり、現代人の生活は絶えず疾患がつきまとわれている。

これらの疾患の治療には様々な薬剤が使われている。我々は薬剤がどのようなものか知っているつもりだが、その定義を聞かれると以外と答え辛いものである。一般的な定義として、‘薬剤は生物に対して適用される物質’であり、‘生命過程に影響を与える化学物質’とされている。今や、これらの薬剤はヒトが生きていく上で必要不可欠なものとなっている。

歴史的にみて創薬は第二次世界大戦後に急速に発展した分野である。現在、医薬品として使用されている化合物は 10000 種を越えていると考えられている。創薬研究は疾患克服のために行われ、その時々 of 社会的要求や疾病構造の変化が薬剤や医療技術を発展させ研究成果をあげてきた。一方、このような疾患克服とは無関係に新薬開発が行われ続けている。その背景には病態解明の進歩とともに、より選択的あるいは特異的に作用を発揮する薬剤の要求、また確実な効果を持つ薬剤や使用しやすい薬剤の要求などがある。多数の同効薬は必要でないと考えられるが、目的の作用に関しては同じ効果といえども生体全体に及ぼす効果には差が存在するため、問題点を明らかにし、それらを解決した新薬の開発は必要不可欠である。そのため、現在、多くの薬剤候補化合物が合成されている。

1-2-2. 新薬開発

一般的な新薬開発は多段階の行程からなる (Fig. 1-1)。薬剤の候補が発見、合成された後に前臨床試験と呼ばれる段階でその化合物の安全性を確認する必要がある。この段階では毒性試験、薬物が体内に投与された後の行方を追及する ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) 試験、製剤化、薬剤の安定性や品質に関する規格試験などが行われる。この段階で合格したものが治療薬として初めてヒトに投与される。臨床試験は第 1 相試験から第 3 相試験の三つの段階に分かれている。それぞれの行程では数年の歳月が必要であり、出発を誤ると、きちんと効果を発揮する薬剤が開発できたとしても時代要求に適合せず、経済的に成り立たないことがある。そのためより迅速な研究成果をあげることが重要視される。各工程の迅速化を考えると臨床試験の段階の迅速化は不可能であると考えられる。この段階では実際にヒトに薬剤を投与し、その薬理評価を行うため少なくとも 3 ~ 5 年の歳月が費やされる必要がある。また、前臨床試験では発見された薬剤候補化合物の安定性や、生体への投与後の行方の追及など各種の試験があるが、比較的重要な試験のため迅速化による弊害を無くす必要がある。そのため、探索研究の段階の迅速化が新薬開発の短縮の最も影響を与えられとされる。

探索研究の段階は物質創製研究、スクリーニング、構造機能解析の段階からなる。現在、新規な薬剤を開発するためにコンビナトリアル合成などにより、多くの薬剤候補化合物が合成されて、生理活性評価が行われている [2-10]。実際の新薬開発に応用させるためには、これらの薬剤候補化合物から新規性のあるターゲットを検索し、大量検体から実際の薬剤になりうる化合物を迅速にスクリーニングする必要性が生じる。この創薬スクリーニングアッセイでは他種類の薬剤候補化合物を大量処理する必要性があり、各薬剤候補化合物は微量であるため、この段階にマイクロチップ技術を適用することはアッセイの迅速化のみならず、製薬企業に求められる開発コストの削減などにも影響を与えられとされる。

一口にマイクロチップ技術と言っても、マイクロアレイ技術とマイクロ流体素子技術に大別される。主に用いられるマイクロアレイ技術ではマイクロ流体素子に比べ大量処理では分があるが、比較的アッセイ量が多くなる傾向があり、希釈濃度のばらつきによる分注精度の問題、解放系のため溶液の蒸発、ウェル間の液跳ねなどによる精度の問題などがある。創薬スクリーニングには容器だけでなくアッセイの切り替え性も重要である。アッセイの種類には酵素免疫測定法（ELISA）や細胞ベースのアッセイ（Cell Based Assay）、各種結合アッセイ（Binding Assay）などがあり、これらのアッセイを組み合わせて評価する必要性がある。

以上述べてきた新規薬剤の標的としては、膜タンパクである G タンパク共役型受容体、細胞内のキナーゼ受容体、核に存在する核内受容体などが挙げられる。特に G タンパク受容体は、ゲノム解析の結果、多くの遺伝子が発見されているため、この受容体は新薬の標的として多くの製薬企業から注目を集められている。

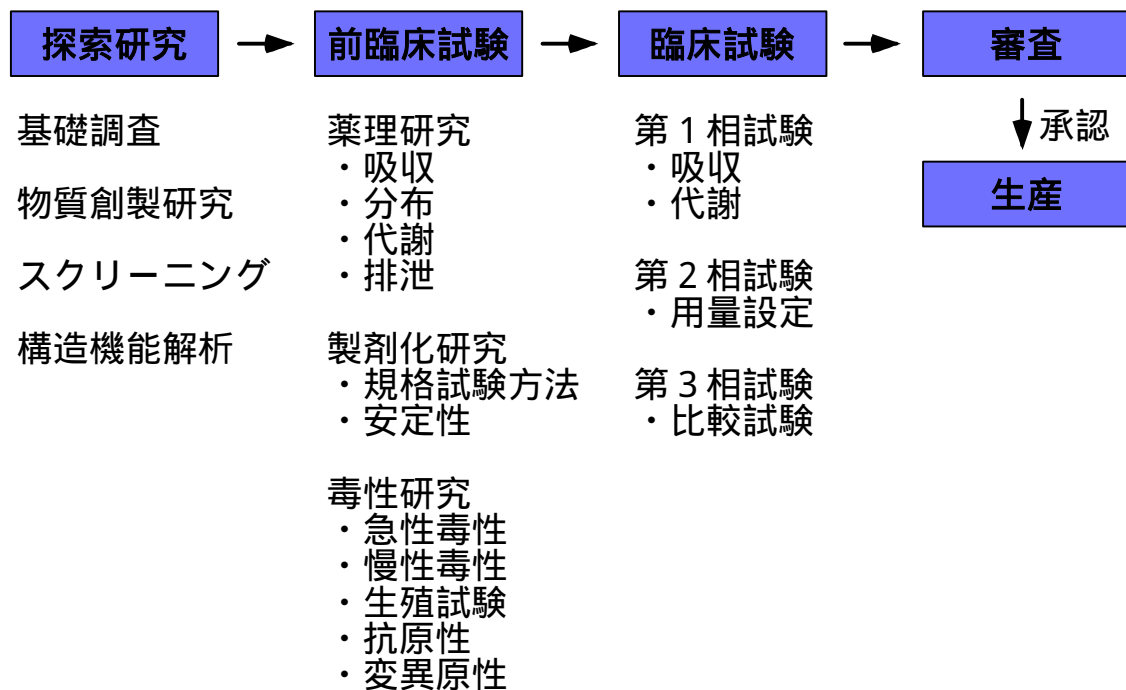


Fig. 1-1. Flow chart of new drugs development.

1-3. G タンパク共役型受容体 (GPCR)

1-3-1. G タンパク質共役型受容体とは

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は細胞膜表面に存在し、細胞外からの多様な情報を細胞内に伝達する機能を有する膜内タンパク質である。このグループに属する受容体タンパク質は7本の α ヘリックス構造を有し、そのヘリックス部分で細胞膜を貫通する共通の構造を有しているため、七回膜貫通型受容体とも呼ばれる (Fig. 1-2)。この GPCR ファミリーに属する受容体タンパク質は、リガンドや光子の結合によってヘテロ三量体の G タンパク質を介して、細胞内にシグナルを伝達する機能を有する [11]。この受容体が細胞内にシグナルを伝達させるため活性化される時、細胞内部分で G タンパク質と会合し $G\alpha$ サブユニットに結合している GDP (guanosine 5'-diphosphate) を GTP (guanosine 5'-triphosphate) に変換させる。その後、 $G\alpha$ -GTP と $G\beta\gamma$ に解離する。 $G\alpha$ -GTP はアデニル酸シクラーゼ、グアニル酸シクラーゼ、ホスホリパーゼ A2、C などと共役し、cAMP (cyclic adenosine 3',5'-monophosphate)、cGMP (cyclic guanosine 3',5'-monophosphate)、IP₃ (inositol 1,4,5-triphosphate)、ジアシルグリセロールといった第二メッセンジャーを産生し、一連の細胞内シグナルが活性化される。また別の経路として細胞内に伝達されたシグナルはカルシウムイオンやカリウムイオンチャネルを開閉しアラキドン酸などの他のメッセンジャーを産生する [12]。その他、多くの GPCR は MAP (mitogen-activated protein) キナーゼを活性化させることができる。このプロセスは一連のアダプタータンパク質のチロシンキナーゼによるリン酸化を含む G タンパク質を介したシグナル伝達経路である。このような細胞内シグナル伝達だけでなく GPCR のシグナル伝達には明らかに複雑なシステムが存在していると考えられている。それは細胞によって異なる代謝応答を誘発したり、様々な遺伝子発現が活性化されることが知られており、この遺伝子発現

の違いが細胞の分化や増殖、視覚、嗅覚といった五感などの高次機能の発現に生理的に重要な役割を果たしているのではないかと考えられているからである。

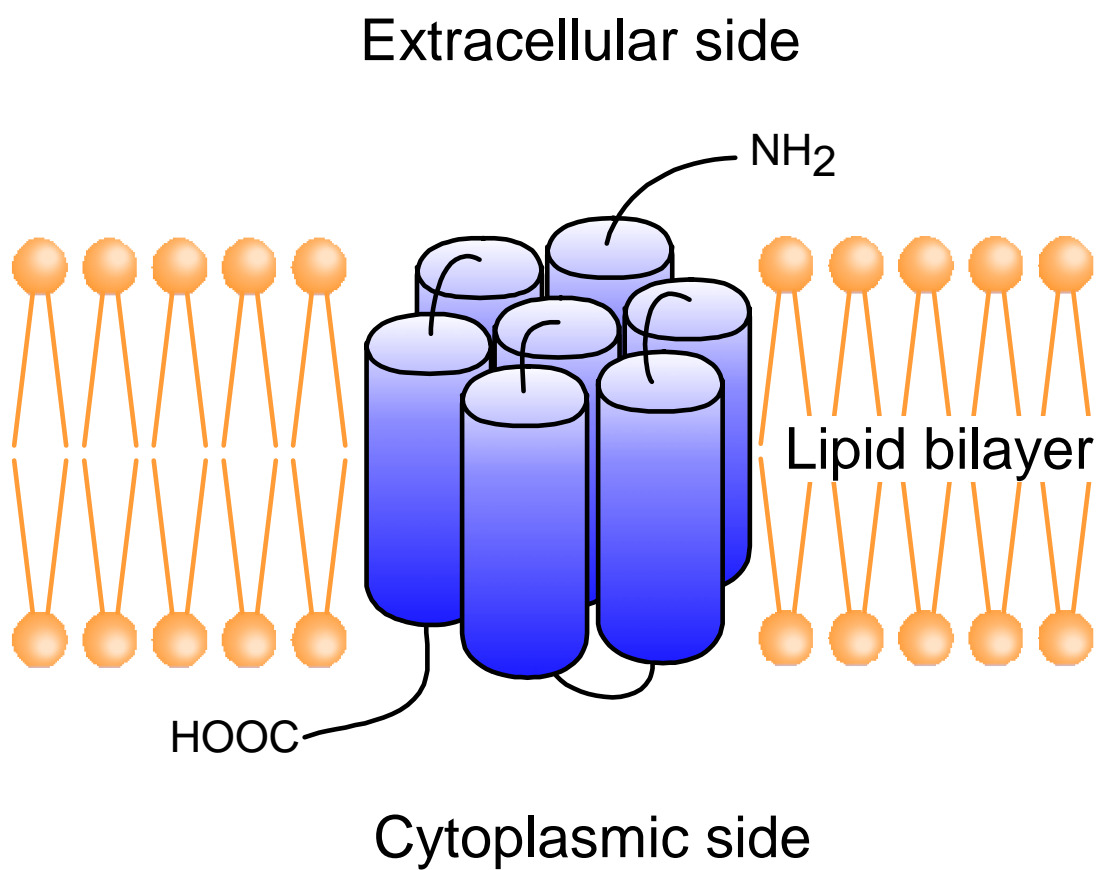


Fig. 1-2. Schematic structure of G-protein-coupled receptor.

1-3-2. GPCR の分類

GPCR は配列の類似性から 6 つのグループに分類される[13] (Table 1-1)。これらのグループの中で最大のグループはロドプシンや他のオプシン(opsin)の受容体群である。このグループ内にはアドレナリン、ドーパミン、ヒスタミンといった生体アミンの受容体や、アンギオテンシン、ブラジキニンといったペプチドの受容体が含まれる。GPCR は一次配列レベルでかなりの多様性を持っており、それを反映するかのよう多くの機能を発揮する。また、この分類におけるグループ間の相互関係は未だ明らかにされていない。

1-3-3. GPCR に結合する内因性リガンド

GPCR に結合するリガンドとして現在までに神経伝達物質、各種のホルモン、ペプチド、増殖因子と幅広い範囲の多くの化合物が知られている (Table 1-2)。多くのリガンドが結合するため、その結合部位や結合様式は様々である[14], [15] (Fig. 1-3)。比較的大きなタンパク質やペプチドは細胞外に出ているループ部分に結合する。各種の薬剤を含む低分子の物質は受容体の膜貫通領域に結合すると考えられている。また、トロンビン受容体のように細胞外の部分が活性化によって、自分自身の膜貫通部分に結合し、機能を発現するリガンド内蔵型の受容体なども知られている。

1-3-4. GPCR の重要性

過去 30 年間、GPCR を標的にした薬物治療はめざましい成功を収めてきた。現在、使用されている薬物の 50%以上がこの GPCR を標的にして、効果を発揮するものだと考えられている[16]。その薬剤の売り上げは世界中の薬剤トップ 100 種のうち、約 4 分の 1 を占め、1997 年の世界中での売上高は約 2 兆円に上る[17](Table 1-3)。このように GPCR は創薬研究において非常に有益で実を結びやすいため、多くの製薬企業が GPCR の研究にかなりのエネルギーを注いでいる。これらの創薬研究で重要なことは受容体のどの部分に薬剤となる

Table 1-1. Sequence-based grouping within the G-protein-coupled receptors.

Clan A: rhodopsin-like receptors	
Family	Olfactory receptors, adenosin receptors, melanocortin receptors,
Family	Biogenic amine receptors
Family	Vertebrate opsins and neuropeptide receptors
Family	Invertebrate opsins
Family	Chemokine, chemotactic, somatostatin, opioids and others
Family	Melatonin receptors and others
Clan B: calcitonin and related receptors	
Family	Calcitonin, calcitonin-like, and CRF receptors
Family	PTH/PTHrP receptors
Family	Glucagon, secretin receptors and others
Family	Latrotoxin receptors and others
Clan C: metabotropic glutamate and related receptors	
Family	Metabotropic glutamate receptors
Family	Calcium receptors
Family	GABA-B receptors
Family	Putative receptors
Clan D: STE2 pheromone receptors	
Clan E: STE3 pheromone receptors	
Clan F: cAMP receptors	

Table 1-2. Endogenous ligands of the GPCRs.

Biogenic amines (and related compounds)	Acetylcholine, adrenaline, dopamine, histamine, melatonin, noradrenaline, serotonin, tyramine
Peptides and proteins	Angiotensin, bradykinin, bombesin, C3a, C5a, calcitonin, chemokines, cholecystokinin, conopressin, corticotropin-releasing factor, decay-accelerating factor, diuretic hormone, endothelin, enkephalines and endorphins, follitropin, fMLP and other formylated peptides, glycoprotein hormones, fungal mating pheromones, galanin, growth hormone-releasing hormone, growth hormone secretagogue, gastric inhibitory peptide, gastrin, glucagon, gonadotropin-releasing hormone, LH glycoprotein hormone, melanocortin, neuropeptide Y, neurotensin, opioids, oxytocin, protease-activated pituitary adenylyl cyclase-activated peptide, PTHrP, secretin, somatostatin, tachykinin, thrombin, thyrotropin-releasing hormone, vasopressin, vasoactive intestinal
Lipids	Anandamide, cannabinoids, leukotrienes, lysophosphatidic acid, platelet-activating
Wicosanoids	Prostacyclins, prostaglandins, thromboxanes
Purines and nucleotides	Adenosine, cAMP, ATP, ADP, UTP, UDP
Excitatory amino acids and ions	Glutamate, calcium, GABA

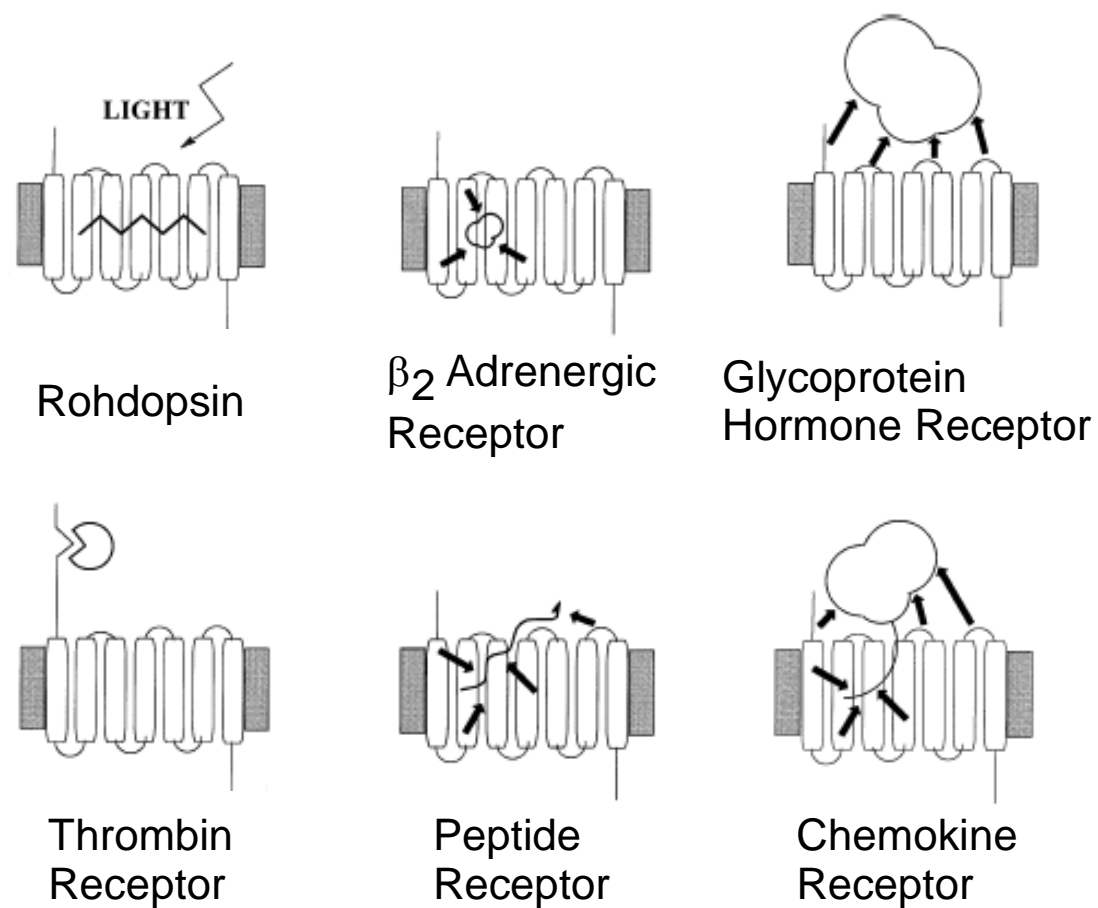


Fig. 1-3. Different modes of ligand binding to GPCRs. Specific contacts between receptor and ligand are shown by dark arrows.

Table 1-3. Market drugs targeted at GPCRs.

Bland name	Drug name	Action
Atrovent	Ipratropium	Mixed muscarinic antagonist
Axid	Nizatidine	H ₂ antagonist
Betaloc	Metoprolol	β ₁ antagonist
Busper	Buspirone	5-HT _{1a} agonist
Cardura	Doxazosine	α ₁ antagonist
Clartin	Loratadine	Antihistamine H ₁ antagonist
Cozzar	Losartan	AT ₁ antagonist
Gaster	Famotidine	H ₂ antagonist
Heitrin	Terazosin	α ₁ antagonist
Imigran	Sumatriptan	5-HT ₁ agonist
Lupron	Leuprolide	LH-RH agonist
Pepcidine	Famotidine	H ₂ antagonist
Prepulsid	Ciaprider	5-HT ₄ ligand
Prostap SR	Leuprorelin	LH-RH agonist
Risperdal	Risperidone	Mixed D ₂ /5-HT ₂ antagonist
Serevent	Salmeterol	β ₂ agonist
Tagamet	Cimetidine	H ₂ antagonist
Tenormin	Atenolol	β ₂ antagonist
Ventlin	Salbutamol	β ₂ agonist
Zantac	Rantidine	H ₂ antagonist
Zoladex	Goserelin	LH-RH agonist
Zyprexa	Olanzapine	Mixed D ₂ /D ₁ /5-HT ₂ antagonist
Zytec	Cetirzine	Antihistamine H ₁ antagonist

リガンドが結合するかであり、多くの製薬企業では受容体の立体構造を予測し、リガンドの結合部位を同定することで新薬開発を加速させている。

また、GPCR の重要性は多くの遺伝性疾患とも密接に関係している点からも挙げられる[17](Table 1-4)。色盲や夜盲症といった視覚障害は、この GPCR の変異が関係したものである。視覚や味覚、嗅覚といった五感に関与している GPCR は、GPCR 全体の半分以上だと言われており、これら五感の異常の解明にも GPCR は有用な標的になると考えられている。更に、近年の研究により HIV が標的細胞に融合し、感染するときにも GPCR の一つであるケモカインの受容体が重要な働きをしていることが示されている[18]。

1-3-5. オーフアン受容体

嗅覚の受容体を含めるとヒトゲノム中には1000～2000種の GPCR の遺伝子が存在していると見積もられており、そのうちの大半がその機能や、受容体に結合するリガンドが不明の受容体である。これらの受容体は‘孤児 (orphan)’という意味の英語からオーファン受容体と呼ばれている。このオーファン受容体はリガンドが判明しておらず、創薬の標的とできないため‘orphan receptor strategy’と呼ばれる手法を使ってリガンドがスリーニングされている[19]。この手法を使うことによって現在までにいくつかのリガンドの発見に成功している[20-24]。今後、このオーファン受容体は更に多くのリガンドが同定され、創薬研究に大きな恩恵をもたらさるうと期待されている。

最後に、GPCR はほ乳類の遺伝子における最大のファミリーを形成している点、現在の創薬の標的にされているという点、機能未知のオーファン受容体が数多く存在している点から、GPCR 研究は今後生理学的に重要な発見につながる可能性を秘めていると考えられている。そのため GPCR を専門にあつかったウェブサイトが多数公開さ

れ(Table 1-5)、それらのサイトを紹介した文献も存在している[25], [26]。これらのデータベースは世界中の研究者が自分の研究室にしながら莫大な情報量を持つ GPCR の情報を引き出すことができ、今後の研究発展に大きな役割を果たしていくと考えられる。

Table 1-4. Hereditary diseases associated with GPCRs.

Disease	Receptor	Mode of inheritance	Type/function of mutation
Color blindness	Red and green opsin	X-link	X chromosome rearrangements
Stationary night blindness	Rohdopsin	AR	Missense mutation
Retinitis pigmentosa	Rohdopsin	AD	Apoptosis of rod cells
Retinitis pigmentosa	Rohdopsin	AR	Null mutaion
Neprogenic DI	V2 receptor	X-link	Loss of function
Isolated glucocorticoid deficiency	ACTH receptor	AR	Loss of function
Hyperfunctioning thyroid adenomas	TSH rceptor	Somatic mutation	Missense
Familial precocious	LH receptor	AD male limited	Missense
Familial hypocalciurie hypercarlcaemia	Ca2+-sensing receptor	AD	Missense
Neonatal severe hyperparathyroidism	Ca2+-sensing receptor	AR	Missense

Table 1-5. G-protein-coupled receptor websites.

Website	URL
GPCRDB:	http://www.gpcr.org/7tm/
NIH:	http://mgddk1.niddk.nih.gov:8000/GPCR.html
GRAP:	http://www-grap.fagmed.uit.no/GRAP/homepage.html
ORDB:	http://senselab.med.yale.edu/senselab/
HORDE:	http://bioinfo.weizmann.ac.il/HORDE/

1-4. ホルミルペプチド受容体 (FPR)

1-4-1. 好中球

好中球とは血液の分類上では白血球の一成分に分類される (Fig. 1-4) [27]。好中球は径約 10 μm の球形の細胞で、細胞質に塩基性色素と酸性色素の両者に淡く染まる多数の小型の特殊顆粒や、それよりやや大きいペルオキシダーゼを含み殺菌にあずかるアズール顆粒を少数持つ。好中球には外敵から身を守るため、以下のような生体防御機能を有していることが知られている。

- 1) 運動能と粘着性 (adherence) : 好中球は偽足を出して前進し、中の核は引き寄せられるように後ろから従っていくという活発な運動能がある。また、表面に存在しているタンパク質セクレチン類や β_2 -integrins (CD11/CD18 複合体)の働きによって他の細胞に粘着する性質を有している[28-31]。この性質のため毛細管内皮細胞のあいだを通して周囲の組織へ遊出することができる。
- 2) 走化性 (chemotaxis) : 化学物質の濃度差を感知して、その化学物質の方向へ集まる性質のことである。細菌由来の N-ホルミルペプチドや炎症部位に生ずる補体成分 (C5a 等)、各種白血球の分泌物、組織の破壊産物などが走化性因子 (chemotactic factor) となり、好中球がそこへ集まることになる [32],[33]。
- 3) 貪食 (phagocytosis) : 炎症部位にたどり着いた好中球は異物を排除するために自分自身に異物を取り込む。この機能を貪食という[34]。正確には取り込まれるものが固形物の時が貪食といい、液状の時は貪飲 (pinocytosis) という。貪食による異物排除の過程は以下の示す手順で行われると考えられて

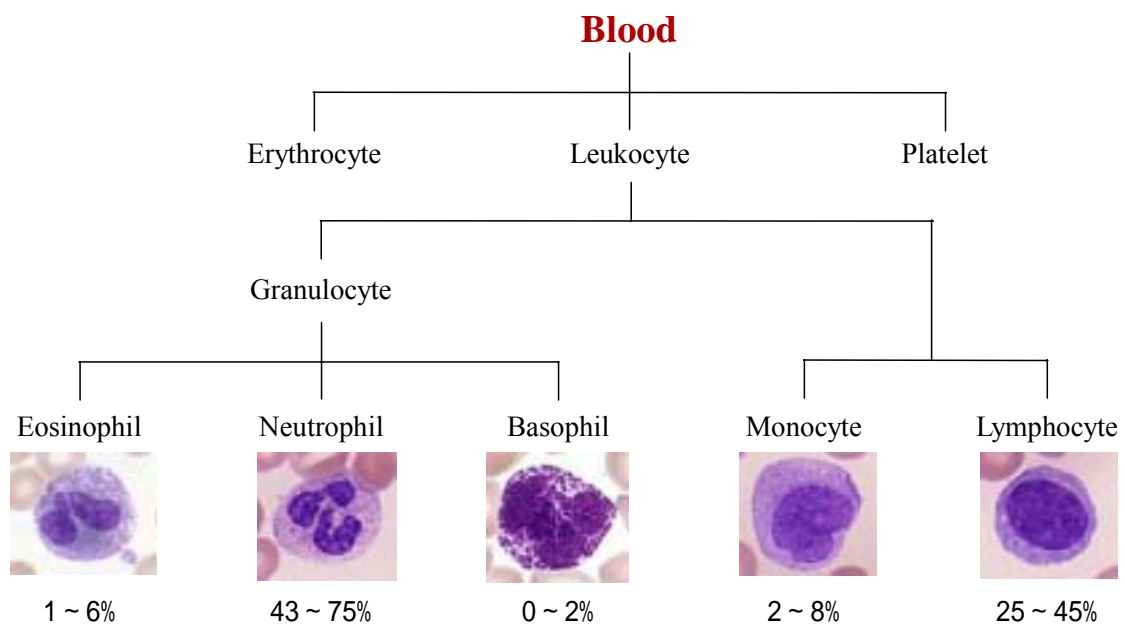


Fig. 1-4. Neutrophil on hematology and abundance ratio.

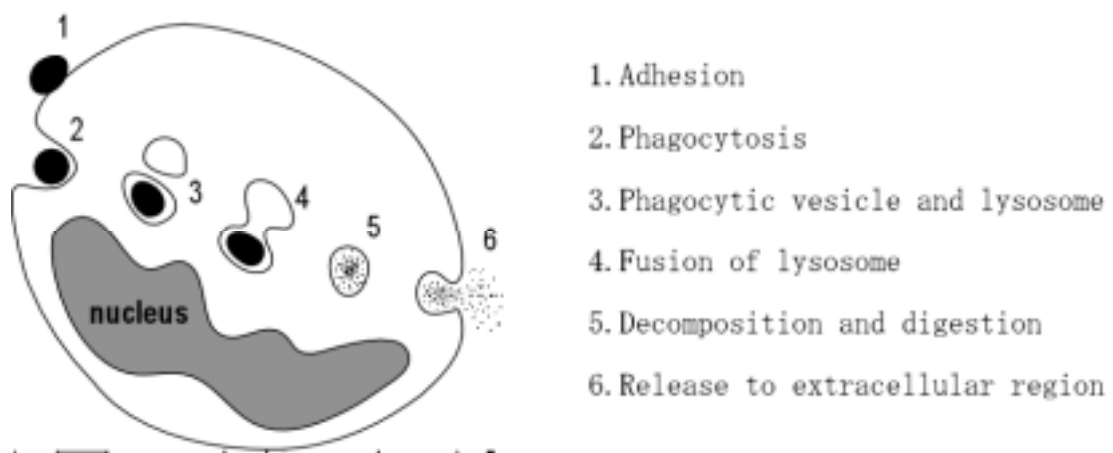


Fig. 1-5. Phagocytosis of neutrophil.

いる (Fig. 1-5)。まず始めに細菌や異物が好中球の粘着性によって表面に付着した後、貪食される。この際、細菌にオプソニン (opsonin) と呼ばれる補体成分や抗体成分が付いていると貪食が容易になる。貪食すると、好中球では急激な酸化代謝が起きる。一方、リソソームは貪食物を入れた食胞と融合し、その内容物を送り込む脱顆粒 (degranulation) という作用を示す。リソソームに含まれたペルオキシダーゼは、酸化代謝で生じた過酸化水素や超酸化物 (superoxide, O_2^-) 等と協同して殺菌作用を示す。またリソソームには多くの加水分解酵素を含んでいるために、貪食物は分解・消化される。

このような好中球の生体防御機能は、細胞膜上のホルミルペプチド受容体 (FPR) ファミリーにリガンドが結合して引き起こされる。このような作用を引き起こす物質として細菌 (*Escherichia coli*) 由来の fMLP (For-Met-Leu-Phe; Fig. 1-6) が最初に発見された。この発見以降、fMLP は構造機能相関研究のプロトタイプとして用いられるようになり [35]、好中球の機能を評価する際に広く使われることとなった。

1-4-2. FPR ファミリー

1990 年、FPR は Boulay らによってクローニングされた [36]。トランスフェクトされた細胞株において FPR は高い親和力で fMLP と結合し、pM から nM オーダーの濃度の fMLP によって活性化されることが見出された。FPR は 350 個のアミノ酸が一系列につながって、細胞膜を 7 回貫通する構造を取っている (Fig. 1-7)。

FPR のホモログとして FPRL1 (FPR-like 1)、FPRL2 (FPR-like 2) が知られている。これらのホモログは Murphy らによってクローニングされた [37]。FPRL1 は μ M オーダーの高濃度の fMLP で活性化されるため、低親和力の fMLP の受容体だと定義された [38]。しかし実際にはこのような高濃度の fMLP が炎症部位で発生するかどうかは定かで

はないので、*in vivo* での FPRL1 の機能は別の所にあるのではないかと考えられている。FPRL2 は FPR や FPRL1 と異なり、好中球には発現しておらず、単球上に発現しており、N-ホルミルペプチドによって活性化できないことが Durstin らによって報告されている[39]。そのため、FPRL2 に関しては未知の部分が多い。FPR や FPRL1 も単に好中球上のみ発現しているのではなく、他の細胞上にも発現し、様々な応答を引き起こしている。これら FPR ファミリーのアミノ酸配列は Fig. 1-7 に、発現場所と機能を Table 1-6 にまとめておく。

近年、この FPR ファミリーはホルミルペプチドだけでなく、様々なリガンドが結合することが報告され、これらの非ホルミルペプチドリガンドを用いた研究が行われている[40-46] (Table 1-7)。これらのリガンドの中には HIV-1 envelope protein の *in vivo* でのペプチドフラグメント(T20, T21, etc.)などが存在しており、HIV-1 の感染の際、FPR や FPRL1 がセンサーとして働いたり、AIDS 患者における免疫応答を引き起こすと報告されている[41]。また、他には急性期タンパク質である serum amyloid A(SAA)、 β amyloid ペプチド ($A\beta_{42}$)、プリオンタンパク質のペプチドフラグメント (PrP106-126)などが FPR ファミリーに結合することが知られており、アルツハイマー病や狂牛病など各種の恐ろしい病気などにもこの FPR ファミリーが関与していると考えられている。これらのことから古くから知られている FPR ファミリーが、再び注目を集め始めている。

1-4-3. FPR のシグナル伝達

FPR は GPCR の一つであるので細胞外から来た情報を細胞内に伝達する機能も有する。多くのグループによって、このシグナル伝達の解明がなされている[50-56]。FPR のシグナルはまず、G タンパク質に伝えられ、その後 phospholipase C (PLC) や phosphoinositide 3-kinase (PI3K)の活性化を引き起こす。活性化された PI3K は phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂)を phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate (PIP₃)に変換する。PIP₃は PLC によって、セカンドメ

ッセンジャーである inositol triphosphate (IP₃)と diacylglycerol (DAG)に変換される。IP₃はカルシウム輸送を調節し、DAGは protein kinase C (PKC)を活性化させる。また別の経路として、phospholipase A₂, Dや mitogen-activated protein kinase (MAPK)を活性化させることも知られている。このようなシグナル伝達により FPR は様々な細胞応答を示す(Fig. 1-9)。

Miettinen らは FPR の変異体を使って、シグナルの開始点であるどの部位で G タンパク質と相互作用しているかを検討している[50]。その結果、第2膜貫通領域に存在する Ser⁶³、Asp⁷¹、第3膜貫通領域に存在する Arg¹²³、また Cys¹²⁴と Cys¹²⁶に同時に変異を加えた受容体では G タンパク質と共役しなくなることが分かった。

Partida-Sánchez らはマウスの好中球を用いて FPR のシグナル伝達の検討を行っている[51]。脊椎動物や植物において cyclic ADP-ribose (cADPR)はカルシウム移動のセカンドメッセンジャーであり、細胞膜の糖タンパク質である CD38 によって産生される。この CD38 がマウスにおける fMLP シグナルに必須であると考えられており、彼らはこの CD38 を欠損させたマウスを用いて実験を行っている。その結果、fMLP が FPR に結合して引き起こされるシグナルは伝達されず、*in vivo*での細菌の炎症部位への遊走をしないことが分かり、また、cADPR が FPR シグナルによって細胞内カルシウム濃度を調節していることを確かめている。

このように FPR は様々な機能発現に関与し、世界中の研究者から広く研究されているため、本研究ではこの受容体を標的に研究を行うことにした。

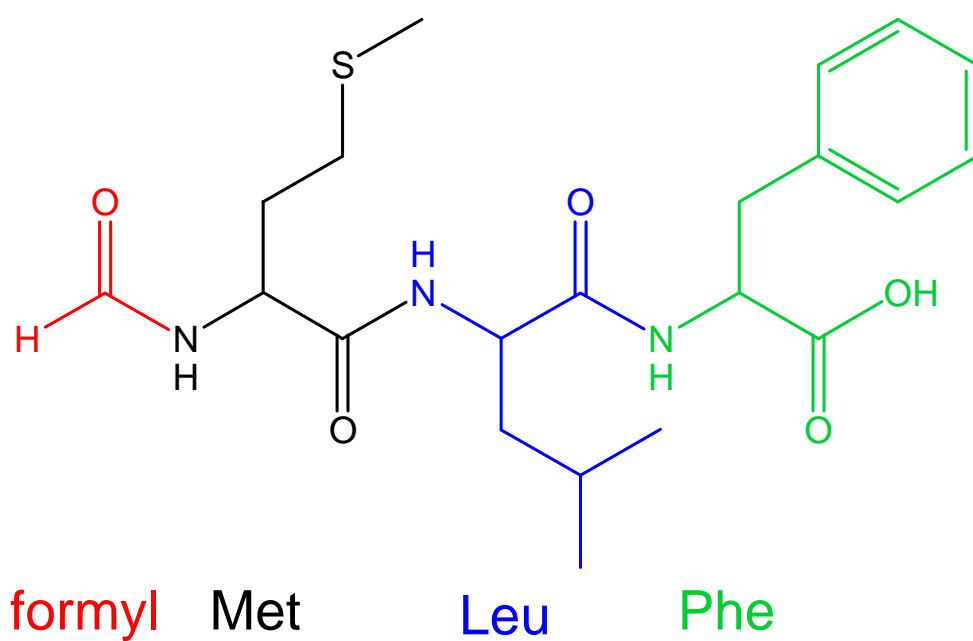


Fig. 1-6. Structure of *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP).

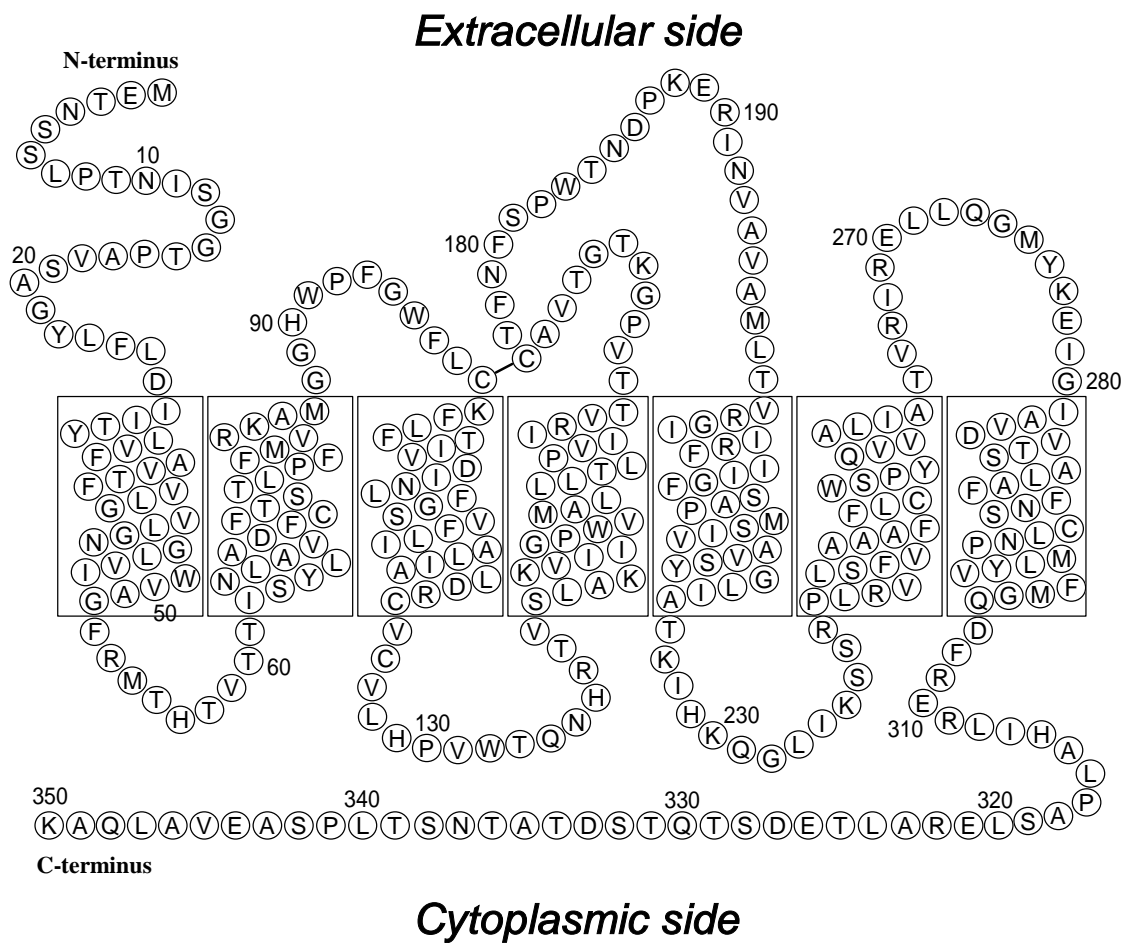


Fig. 1-7. Structure of FPR. FPR consists with 350 amino acids. There are seven transmembrane domains which showed by Roman number.

10	20	30	40	50	60
METNSSLPTN	ISGGTPAVSA	GYLFLDIITY	LVFAVTFVLG	VLGNGLVIWV	AGFRMTHTVT
METNFSTPLN	EYEEVSYESA	GYTVLRILPL	VVLGVTFVLG	VLGNGLVIWV	AGFRMTRTVT
METNFSIPLN	ETEEVLPEPA	GHTVLWIFSL	LVHGVTFVFG	VLGNGLVIWV	AGFRMTRTVN
70	80	90	100	110	120
TISYLNLAFA	DFCFTSTLPF	FMVRKAMGGH	WPFGWFLCKF	LFTIVDINLF	GSVFLIALIA
TICYLNLAFA	DFSFTATLPF	LIVSMAMGEK	WPFGWFLCKL	IHIVVDINLF	GSVFLIGFIA
TICYLNLAFA	DFSFSAILPF	RMVSVAMREK	WPFASFLCKL	VHVMIDINLF	VSVYLITIIA
130	140	150	160	170	180
LDRCVCVLHP	VWTQNHRTVS	LAKKVIIGPW	VMALLLTLPV	IIRVTTVPGK	TGTVACTFNF
LDRCICVLHP	VWAQNHRTVS	LAMKVIIGPW	ILALVLTLPV	FLFLTITVTP	NGDTYCTFNF
LDRCICVLHP	AWAQNHRTMS	LAKRVTGLW	IFTIVLTLPN	FIFWTTISTT	NGDTYCTFNF
190	200	210	220	230	240
SPWTNDPKER	INVAVAMLTV	RGIIRFIIGF	SAPMSIVAVS	YGLIATKIHK	QGLIKSSRPL
ASWGGTPEER	LKVAITMLTA	RGIIRFVIGF	SLPMSIVAIC	YGLIAAKIHK	KGMIKSSRPL
AFWGDTAVER	LNVFITMAKV	FLILHFIIGF	TVPMSIITVC	YGIIAAKIHK	NHMIKSSRPL
250	260	270	280	290	300
RVLSFVAAAF	FLCWSPYQVV	ALIATVRIRE	LLQGMKEIG	IAVDVTSALA	FFNSCLNPM
RVLTAVVASF	FICWFPPQLV	ALLGTVWLKE	MLFYGKYKII	DILVNPTSSL	AFFNSCLNPM
RVFAAVVASF	FICWFPEYELI	GILMAVWLKE	MLLNGKYKII	LVLINPTSSL	AFFNSCLNPI
310	320	330	340	350	
YVFMGQDFRE	RLIHALPASL	ERALTEDSTQ	TSDTATNSTL	PSAEVALQAK	
LYVFMGQDFR	ERLIHSLPTS	LERALSEDSE	PTNDTAANSA	SPPAETELQA	M
LYVFMGRNFQ	ERLIRSLPTS	LERALTEVPD	SAQTSNTHTT	SASPPEETEL	QAM

Fig. 1-8. Sequence of FPR family. Top: human FPR (350AA, 38401Da), middle: human FPRL1 (351AA, 38964Da), bottom: human FPRL2 (353AA, 40015Da)

Table 1-6. Expression of FPR family.

Receptors		Sequence similarity (%)	Cell and/or tissue expression	Major responses
Gene	Protein			
<i>FPR1</i>	FPR		monocyte, polymorphonuclear neutrophil, dendritic cell	Ca ²⁺ mobilization, migration, mediator release and desensitization of other chemoattractant receptors
			hepatocyte, lung alveolar carcinoma cell	release of acute phase proteins
			astrocytes	Ca ²⁺ flux, migration, cytokine production
<i>FPRL1</i>	FPRL1	69 to FPR	monocyte, polymorphonuclear neutrophil, immature dendritic cell	Ca ²⁺ flux, migration, mediator release and desensitization of other chemoattractant receptors
			microglia	Ca ²⁺ flux, migration, cytokine production
			astrocytes	cytokine production
			T cell	Chemotaxis
<i>FPRL2</i>	FPRL2	58 to FPR 72 to FPRL1	monocyte, dendritic cell	Ca ²⁺ mobilization, chemotaxis, oxidase activation

Table 1-7. FPR family agonists and antagonists.

	Origin	Receptor	EC ₅₀ or IC ₅₀
Agonist			
Bacterial peptide			
fMLP and analogs	<i>Escherichia coli</i>	FPR	0.1-1 nM
		FPRL1	1 μM
		mFPRL1	1 μM
		mFPRL2	10 μM
Hp (2-20)	<i>Helicobacter pylori</i>	FPRL1	0.3 μM
		FPRL2	10 μM
HIV-1 envelope peptides			
T20 (DP178)	HIV-1 _{LAV} gp41 (aa643-678)	FPR	0.5 μM
		mFPRL1	0.1 μM
		mFPRL2	0.5 μM
T21 (DP107)	HIV-1 _{LAV} gp41 (aa558-595)	FPR	0.5 μM
		FPRL1	50 nM
F peptide	HIV-1 _{BRU} gp120 (aa411-434)	FPRL1	10 μM
V3 peptide	HIV-1 _{MN} gp120 (V3 loop)	FPRL1	2 μM
		mFPRL2	1 μg/ml
Peptide library derived agonists			
W peptide (WKYMVDM)	random peptide library	FPR	1 nM
		FPRL1	1 pM
		FPRL2	5 nM
		mFPRL1	50 nM
		mFPRL2	1 nM
MMK-1	random peptide library	FPRL1	0.5 nM
		mFPRL2	0.5 nM
WKYMVM	random peptide library	FPRL1	2 nM
		FPRL2	80 nM
Host-derived agonists			
Ac1-26	annexin I (aa1-26)	FPR	5 μM
LXA4	lipid metabolite	FPRL1	1 nM
		mLXA4R	1.5 nM (Kd)
SAA	acute phase protein	FPRL1	0.1 μM
		mFPRL2	1 μM
Aβ ₄₂	APP (aa1-42)	FPRL1	1 μM
		mFPRL2	2 μM
PrP106-126	Prion (aa106-126)	FPRL1	25 μM
Antagonists			
Boc-FLFLF	synthetic peptide	FPR	2 μM
CsH	fungus	FPR	0.5 μM
DCA	bile acid	FPR	100 μM
Spinorphin	cerebrospinal fluid	FPR	50 μM

Abbreviations: Aβ, amyloid β; APP, amyloid precursor protein; CsH, cyclosporine H; DCA, deoxycholic acid; mFPR, murine FPR; PrP, prion protein; SAA, serum amyloid A.

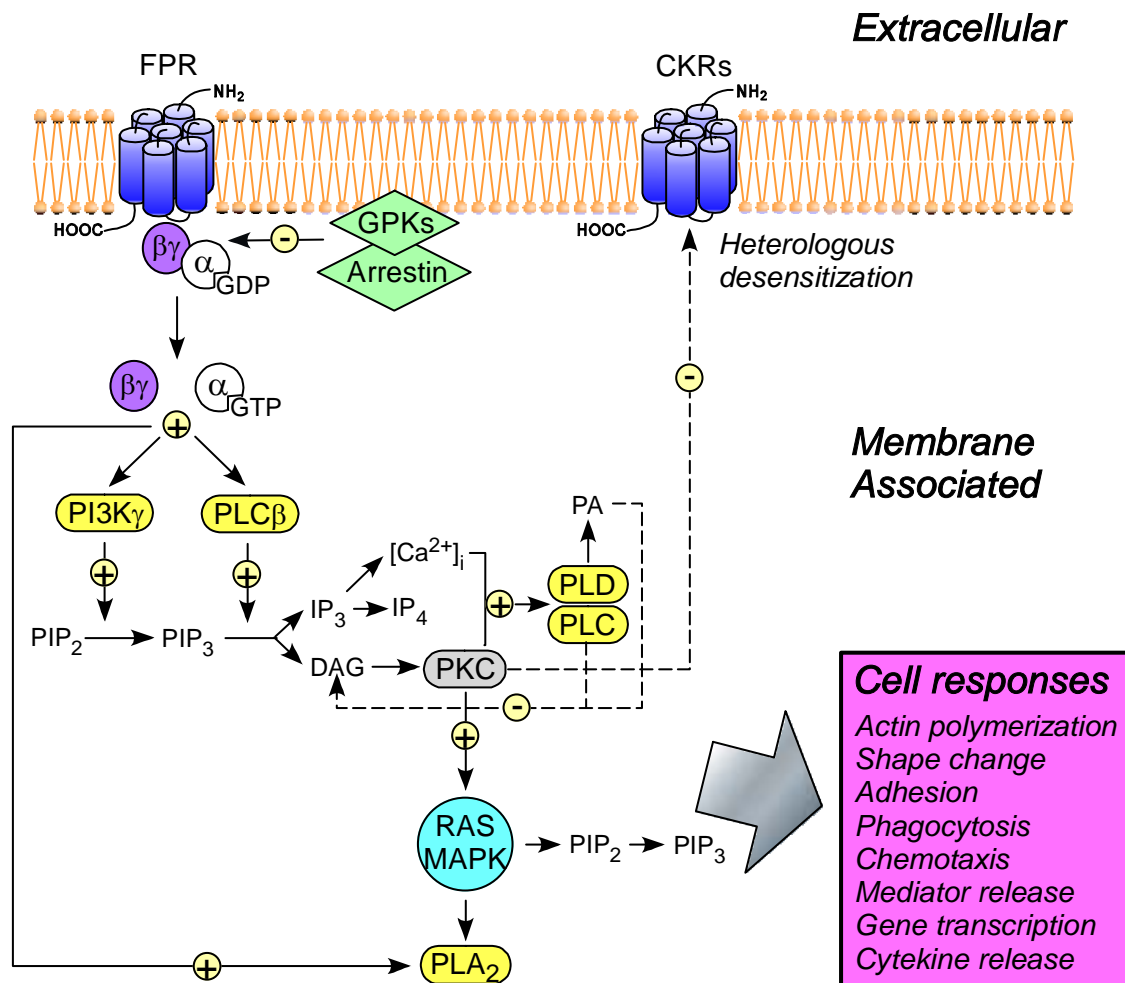


Fig. 1-9. Schematic signaling pathways of activated FPR [40].

本研究は、薬剤と標的受容体の相互作用機構の解析方法の検討し（第2，3章）、簡便な薬剤検索システムの開発（第4，5章）を目指して研究を行ったもので、全6章から構成されている。この第1章は研究背景として、標的にした受容体タンパク質の重要性および、現在までに解明されている役割について述べてきた。

第2章では、標的にしたFPRに作用させるペプチドアナログのデザインと合成について述べる。第3章では、合成したペプチドアナログをホルミルペプチド受容体に作用させたときの生理活性評価と、光架橋による同受容体の検出について述べ、薬剤と標的受容体の相互作用機構の解析方法を検討する。

第4章では、実際の薬物検索システムに応用させるために用いたマイクロリアクターと呼ばれるマイクロチップの作製について述べていく。第5章では、4章で作製したマイクロリアクターを用いた研究結果から薬剤検索システムとしての評価を行っていく。

そして最後の第6章では、本研究のまとめ及び研究成果の学術的、社会的位置づけについて述べる。

1-5. 参考文献

- [1] Venter, J.C., *et al.* (2001) *Science*, **291**, 1304-1351.
- [2] Wentworth, P. Jr. (1999) *Trends Biotechnol.*, **17**, 448-452.
- [3] Floyd, C.D., Leblanc, C. and Whittaker, M. (1999) *Prog. Med. Chem.*, **36**, 91-168.
- [4] Dolence, E.K., Dolence, J.M. and Poulter, C.D. (2000) *J. Comb. Chem.*, **2**, 522-536.
- [5] Kay, B.K., Kasanov, J. and Yamabhai, M. (2001) *Methods*, **24**, 240-246.
- [6] Sun, Y., Lu, G. and Tam, J.P. (2001) *Org. Lett.*, **3**, 1681-1684.
- [7] Nicolaou, K.C., Hughes, R., Cho, S.Y., Winssinger, N., Labischinski, H. and Endermann, R. (2001) *Chem. Eur. J.*, **7**, 3824-3843.
- [8] Burkoth, T.S., Beausoleil, E., Kaur, S., Tang, D., Cohen, F.E. and Zuckermann, R.N. (2002) *Chem. Biol.*, **9**, 647-654.
- [9] Breinbauer, R., Vetter, I.R. and Waldmann, H. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 2878-2890.
- [10] Rodda, S.J. (2002) *J. Immunol. Methods*, **267**, 71-77.
- [11] Morris, A.J. and Malbon, C.C. (1999) *Physiol. Rev.*, **79**, 1373-1430.
- [12] Clapham, D.E. (1994) *Annu. Rev. Neurosci.*, **17**, 441-464.
- [13] Kolakowski, L.F. Jr. (1994) *Receptors Channels*, **2**, 1-7.
- [14] Gether, U. (2000) *Endocr. Rev.*, **21**, 90-113.
- [15] Bockaert, L. and Pin, J.P. (1999) *EMBO J.*, **18**, 1723-1729.
- [16] Gudermann, T., Nurnberg, B. and Schultz, G. (1995) *J. Mol. Med.*, **73**, 51-63.
- [17] Flower, D.R. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1422**, 207-234.
- [18] Littman, D.R. (1998) *Cell*, **93**, 677-680.
- [19] Civelli, O. (1998) *FEBS Lett.*, **430**, 55-58.
- [20] Civelli, O., Reinscheid, R.K. and Nothacker, H.-P. (1999) *Brain Res.*,

848, 63-65.

- [21] Meunier, J.C., Mollereau, L., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J.L., Guillemot, J.C., Ferrara, P., Monsarrat, B., Mazarguil, H., Vassart, G., Parmentier, M. and Costentin, J. (1995) *Nature*, **377**, 532-535.
- [22] Reinscheid, R.K., Nothacker, H.P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R.A., Bunzow, J.R., Grandy, D.K., Langen, H., Monsma, F.J. Jr. and Civelli, O. (1995) *Science*, **270**, 792-794.
- [23] Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., Arch, J.R.S., Buckingham, R.E., Haynes, A.C., Carr, S.A., Annan, R.S., McNulty, D.E., Liu, W.S., Terret, J.A., Elshourbagy, N.A., Bergsma, D.J. and Yanagisawa, M. (1998) *Cell*, **92**, 573-585.
- [24] Hinuma, S., Habata, Y., Fujii, R., Kawamata, Y., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kitada, C., Masuo, Y., Asano, T., Matsumoto, H., Sekiguchi, M., Kurokawa, T., Nishimura, O., Onda, H. and Fujino, M. (1998) *Nature*, **393**, 272-276.
- [25] Rana, B.K. and Insel, P.A. (2001) *Trends Pharmacol. Sci.*, **22**, 485-486.
- [26] Rana, B.K. and Insel, P.A. (2002) *Trends Pharmacol. Sci.*, **23**, 535-536.
- [27] 日野志郎 「臨床血液学」(医師薬出版株式会社) 1987.
- [28] Jordan, E.J., Zhao, Z.-Q. and Vinten-Johansen, J. (1999) *Cardiovasc Res.*, **43**, 860-878.
- [29] Wang, Q. and Doerschuk, C.M. (2002) *Antioxid. Redox Signal*, **4**, 39-47.
- [30] Carlos, T.M. and Harlan, J.M. (1994) *Blood*, **84**, 2068-2101.
- [31] Laudanna, C., Campbell, J.J. and Butcher, E.C. (1996) *Science*, **271**, 981-983.
- [32] Wagner, J.G. and Roth, R.A. (2000) *Pharmacol. Rev.*, **52**, 349-374.

- [33] Prossnitz, E.R. and Ye, R.D. (1997) *Pharmacol. Ther.*, **74**, 73-102.
- [34] Zakhireh, B., Block, L.H. and Root, R.K. (1979) *Infection*, **7**, 88-98.
- [35] Showell, H.J., Freer, R.J., Zigmond, S.H., Schiffmann, E., Aswanikumar, S., Corcoran, B. and Becker, E.L. (1976) *J. Exp. Med.*, **143**, 1154-1169.
- [36] Boulay, F., Tardif, M., Bouchon, L. and Vignais, P. (1990) *Biochemistry*, **29**, 11123-11133.
- [37] Murphy, P.M., Özçelik, T., Kenney, R.T., Tiffany, H.L., McDermott, D. and Francke, U. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 7637-7643.
- [38] Murphy, P.M. (1997) *Pharmacol. Ther.*, **74**, 73-102.
- [39] Durstin, M., Gao, J.L., Tiffany, H.L., McDermott and D., Murphy, P.M. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 174-179.
- [40] Su, S.B., Gong, W., Gao, J.-L., Shen, W., Murphy, P.M., Oppenheim, J.J. and Wang, J.M. (1999) *J. Exp. Med.*, **189**, 395-402.
- [41] Le, Y., Oppenheim, J.J. and Wang, J.M. (2001) *Cytokine Growth Factor Rev.*, **12**, 91-105.
- [42] Yazawa, H., Yu, Z.-X., Takeda, K., Le, Y., Gong, W., Ferrans, V.J., Oppenheim, J.J., Li, C.C.H. and Wang, J.M. (2001) *FASEB J.*, **15**, 2454-2462.
- [43] Tiffany, H.L., Lavigne, M.C., Cui, Y.-H., Wang, J.-M., Leto, T.L., Gao, J.-L. and Murphy, P.M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 23645-23652.
- [44] Le, Y., Gong, W., Tiffany, H.L., Tumanov, A., Nedospasov, S., Shen, W., Dunlop, N.M., Gao, J.-L., Murphy, P.M., Oppenheim, J.J. and Wang, J.M. (2001) *J. Neurosci.*, **21**, 1-5.
- [45] Le, Y., Murphy, P.M. and Wang, J.M. (2002) *Trends Immunol.*, **23**, 541-548.
- [46] Cui, Y.H., Le, Y., Zhang, X., Gong, W., Abe, K., Sun, R., Van Damme, J., Proost, P. and Wang, J.M. (2002) *Neurobiol. Dis.*, **10**, 366-377.
- [47] Yang, D., Chen, Q., Gertz, B., He, R., Phulsuksombati, M., Ye, R.D. and Oppenheim, J.J. (2002) *J. Leukoc. Biol.*, **72**, 598-607.

- [48] Cui, Y., Le, Y., Yazawa, H., Gong, W. and Wang, J.M. (2002) *J. Leukoc. Biol.*, **72**, 628-635.
- [49] Svensson, L., Dahlgren, C. and Wennerås, C. (2002) *J. Leukoc. Biol.*, **72**, 810-818.
- [50] Ali, H., Richardson, R.M., Tomhave, E.D., Didsbury, J.R. and Snyderman, R. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 24247–24254.
- [51] Haribabu, B., Zhelev, D.V., Pridgen, B.C., Richardson, R.M., Ali, H. and Snyderman, R. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 37087–37092.
- [52] Leopoldt, D., Hanck, T., Exner, T., Maier, U., Wetzker, R. and Nürnberg, B. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 7024–7029.
- [53] Torres, M., Hall, F.L. and O'Neill, K. (1993) *J. Immunol.*, **150**, 1563–1578.
- [54] Rane, M.J., Carrithers, S.L., Arthur, J.M., Klein, J.B. and McLeish, K.R. (1997) *J. Immunol.*, **159**, 5070–5078.
- [55] Miettinen, H.M., Gripenstrog, J.M., Mason, M.M. and Jesaitis, A.J. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 27934-27942.
- [56] Partida-Sánchez, S., Cockayne, D.A., Monard, S., Jacobson, E.L., Oppenheimer, N., Garvy, B., Kusser, K., Goodrich, S., Howard, M., Harmsen, A., Randall, T.D. and Lund, F.E. (2001) *Nat. Med.*, **7**, 1209-1216.

第2章

Design and Synthesis of Formyl-peptide Analogs

ホルミルペプチドアナログの デザインと合成

新規な薬剤を開発する上で重要なことは、薬剤と標的タンパク質がどのように結合し、どのような機能を有するかを明らかにすること、効率的な評価システムが存在するかの2点だと考えられる。2章、3章では前者の薬剤と標的受容体の相互作用機構の解析方法を検討する。

まずこの章では、本研究で標的にした FPR ファミリー (FPR、FPRL1) に作用させるためのリガンドであるホルミルペプチドアナログのデザインと合成について述べていく。

2-1. 構造活性相関

FPR の発見以降、数多くの fMLP をプロトタイプとしたホルミルペプチドアナログがデザイン、合成され、それらを使った構造活性相関研究が行われてきた[1-13]。

これらの研究によって、ホルミルペプチドアナログと FPR の相互作用、活性発現に必要ないくつかの構造要因が示された。

1) *Formyl Group*. Freer らは fMLP のホルミル基を様々な修飾した一連のペプチドアナログを使ってホルミル基の重要性について検討を行っている[1]。ホルミル基を除去した fMLP アナログ、他のアシル基であるアセチル基にしたアナログ、アミノ基を除去したアナログ、エチル基で置換したアナログは fMLP と比較して酵素リソソームの放出能、走化性、受容体への結合能は完全に消失した (Table 2-1)。これはホルミル基の水素原子と、受容体の水素結合アクセプター (カルボニル基) の相互作用がなくなったためではないかと考えられている。これらのことから、N 端のホルミル基はホルミルペプチドアナログをデザインする上で必須の構造ではないかと考えられる。

しかしながら近年の研究では、非ホルミルペプチドアナログ

でも活性があるという報告がなされており、N 端ホルミル基は必ずしも必要ではない可能性も示されている。

2) *Methionine Side Chain*. Freer らは fMLP の 1 位メチオニン残基を他の S 原子含有残基、脂肪族の側鎖を持つ残基に置換した一連のペプチドアナログを使ってメチオニン残基の重要性について検討を行っている[1]。最も活性があったアナログはメチオニン側鎖の S 原子を C 原子に置き換えた For-Nle-Leu-Phe であったが、fMLP の最大活性を越えるアナログはなかった (Table 2-2)。

これらの結果から Freer らはメチオニン側鎖が受容体の疎水性ポケットを占有しているのではないかと提案している。炭素数 4 つ以上の側鎖の長さを持つアナログでは活性が消失するため、このポケットは長さに限界があると考えられる。また、ポケットの占有容量の問題もあり、枝分かれの炭素を持つ Leu アナログ、1 位で枝分かれを持つ Val アナログ、炭素数 3 つの側鎖を持つ Nva アナログは Nle アナログと比較して活性が減少する。更に、fMLP と Nle アナログ、Cys(Me)アナログとの比較から、メチオニン側鎖の比較的 electron-rich の S 原子の周りには正電荷の部位があるのではないかと考えられている。

3) *Leucine Side Chain*. Freer らは fMLP の 2 位ロイシン残基を他の S 原子含有残基、脂肪族の側鎖を持つ残基に置換した一連のペプチドアナログを使ってロイシン残基の重要性について検討を行っている[2]。これらのアナログの酵素リソソーム放出能は疎水性側鎖が短くなるに従って減少した (Gly < Ala < Abu < Nva アナログ) (Table 2-3)。しかしながら、1 位に枝分かれを持つ Val アナログや側鎖の長い Nva, Ile, Cys(Me)アナログでは活性の現象は引き起こされなかった。これらの結果から 2 位のロイシンは疎水性ポケットと相互作用しているのではないかと提案

され、この2位は比較的長い疎水性な残基の置換を許容すると考えられる。

また、Dentinoらはロイシン残基よりも立体的に大きな Ac₆c, Dpg, Phe 残基置換したアナログで酵素β-glucuronidaseの放出能について検討を行っている[6]。これらのアナログでも活性の減少が認められず、Ac₆c アナログ以外のアナログでは増加が認められた (Table 2-4)。これらのことから2位の疎水性ポケットは比較的大きな容量を持っていると推測される。

4) *Phenylalanine Side Chain*. 3位フェニルアラニン残基も受容体の疎水性ポケットと相互作用し、活性を発現しているのではないかと考えられている。この3位を荷電を持った残基で置換すると活性は減少する。また、フェニルアラニンのパラ位を置換した *p*-Cl-Phe アナログや Tyr アナログでも活性の減少が引き起こされることから、この疎水性ポケットには深さの制限があると提案されている[7]。更に、側鎖をアミノ基に転移させた Bzl-Gly アナログでは全く活性がなくなると報告されており、比較的厳密に側鎖の位置を認識しているのではないかと考えられる[12]。

5) *Phenylalanine Carbonyl*. 3位フェニルアラニン残基のカルボニル基の重要性も検討されている。このカルボニル基を除去したβ-phenetylamine (Pea)アナログの生理活性は完全に消失すると報告されている[1]。メチルエステルで置換したアナログでは活性を維持し (Table 2-4)、ベンジルエステルやベンジリアミドで置換した場合には活性の増強が認められる (Table 2-5)。また、疎水性の残基を4位に導入した場合も活性の増強が認められる。これらの結果からフェニルアラニン残基のカルボニル基は水素結合によって受容体と相互作用していると提案されている。

これらの fMLP の特定残基を非天然あるいは天然アミノ酸に置換し生理活性評価を行う研究は、主に 80 年代～90 年代中頃まで行われていた。しかし 90 年代にはいると FPR を活性化させるリガンドが非ホルミルペプチド (Ac-MNleLFF, H-MNleLFF) だけでなくタンパク質のフラグメント (T20, A β ₄₂) やペプチドライブラリー由来の化合物 (W peptide, MMK-1) など多岐にわたることが判明したため、これらのリガンドを用いた研究が行われるようになった[14-18]。また、従来の fMLP を基にした研究は、特定の生理活性を発現するアナログの開発などにシフトし、特定の生理活性を区別する試みがなされるようになった[19-25] (Table 2-6)。

FPR の機能としては好中球を炎症部位に走化させる細胞遊走能や、細菌を死滅させるために放出される活性酸素産生能がある。ホルミルペプチドのプロトタイプである fMLP はこの両方の生理活性を示すが、近年の研究から一方の活性しか持たない fMLP アナログが発見されている。例えば、細胞遊走能のみ示すものには、Ferretti らによって報告されている For-Thp-Leu-Phe-OMe, For-Met-Leu-Ain-OMe や [19]、Torrini らに報告されている For-Thp-Leu- Δ^Z Phe-OMe[20]、Zecchini らによって報告されている MeOCO-Met-Leu-Phe-OMe, Boc-Met-Leu-gPhe-COOMe などが挙げられる[21]。

一方、活性酸素放出能のみ示すものには、Cavicchioni らによって報告されている For-Met-Xaa-Phe-OMe (Xaa: Ser, Ser(Bzl), Cys, Cys(Bzl), Tyr, Tyr(Bzl), Lys, Lys(Z))や[22], [23]、2 位の Leu 残基の位置を Leu, Aib (2-amino- isobutyric acid), Pro からなる dipeptide で置換したアナログや[24]、2 位に反応性側鎖を導入させた di-tripeptide タイプの For-Met-Xaa(For-Met-Leu-Phe)-Phe-OMe (Xaa: Ser, Lys) [25]、Torrini らによって報告されている For-Thp-Ac_{6c}-Phe-OMe[26]、Ferretti らによって報告されている For-Met- Δ^Z Leu-Phe-OMe, For-Met-Leu-Pheol-Ac などが挙げられる[19]。これらの活性酸素選択性のアナログは主に 2 位の Leu 残基の位置を置換したものが多く、この 2 位の bulky なアミノ酸置換は活性酸素選択性を示すと考えられる。

Table 2-1. Requirement of formyl group for biological activity.

Structure	ED ₅₀ for chemotaxis (M)
For-Met-Leu-Phe-OH	$(9.1 \pm 1.0) \times 10^{-11}$
H-Met-Leu-Phe-OH	$(6.7 \pm 1.9) \times 10^{-7}$
Ac-Met-Leu-Phe-OH	$(2.0 \pm 1.1) \times 10^{-7}$
desamino-Met-Leu-Phe-OH	$(2.0 \pm 1.1) \times 10^{-7}$
2-ethylhexanoyl-Leu-Phe-OH	$(1.9 \pm 0.4) \times 10^{-7}$

Data from Ref. [1]

Table 2-2. Requirement of the position 1 (methionine) side chain for biological activity.

Structure	ED ₅₀ for chemotaxis (M)
For-Met-Leu-Phe-OH	$(9.1 \pm 1.0) \times 10^{-11}$
For-Nle-Leu-Phe-OH	$(6.6 \pm 1.2) \times 10^{-10}$
H-Nle-Leu-Phe-OH	$(9.1 \pm 5.9) \times 10^{-6}$
desamino-Nle-Leu-Phe-OH	$(4.6 \pm 2.2) \times 10^{-7}$
For-Gly-Leu-Phe-OH	$(4.3 \pm 1.1) \times 10^{-6}$
For-Ala-Leu-Phe-OH	$(3.4 \pm 1.6) \times 10^{-6}$
For-Abu-Leu-Phe-OH	$(3.8 \pm 1.1) \times 10^{-7}$
For-Nva-Leu-Phe-OH	$(5.8 \pm 2.1) \times 10^{-9}$
For-Hep-Leu-Phe-OH	$(3.3 \pm 1.0) \times 10^{-10}$
For-Cys(Me)-Leu-Phe-OH	$(2.4 \pm 0.3) \times 10^{-8}$
For-Eth-Leu-Phe-OH	$(4.3 \pm 1.1) \times 10^{-10}$
For-Phe-Leu-Phe-OH	$(1.5 \pm 0.7) \times 10^{-7}$
For-Ile-Leu-Phe-OH	$(2.6 \pm 1.0) \times 10^{-10}$
For-Val-Leu-Phe-OH	$(7.2 \pm 1.9) \times 10^{-9}$
For-Leu-Leu-Phe-OH	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^{-8}$
For-Cyl-Leu-Phe-OH	$(4.2 \pm 0.8) \times 10^{-7}$

Data from Ref. [1]

Nle: norleucine, Abu: α -aminobutyric acid, Nva: norvaline, Hep: α -aminoheptanoic acid, Cys(Me): S-methylcystein, Eth: ethiomine, Cyl: cycloleucine

Table 2-3. Requirement of the position 2 (leucine) side chain for biological activity.

Structure	ED ₅₀ for lysozyme release (M)
For-Met-Leu-Phe-OH	$(5.5 \pm 2.2) \times 10^{-10}$
For-Met-Leu-Phe-OBzl	$(4.6 \pm 1.2) \times 10^{-11}$
For-Met-Gly-Phe-OBzl	$(6.7 \pm 3.3) \times 10^{-6}$
For-Met-Ala-Phe-OBzl	$(1.2 \pm 0.5) \times 10^{-8}$
For-Met-Abu-Phe-OBzl	$(5.5 \pm 3.2) \times 10^{-10}$
For-Met-Nva-Phe-OBzl	$(5.2 \pm 1.8) \times 10^{-11}$
For-Met-Val-Phe-OBzl	$(4.5 \pm 1.4) \times 10^{-11}$
For-Met-Ile-Phe-OBzl	$(6.5 \pm 2.1) \times 10^{-11}$
For-Met-Cys(Me)-Phe-OBzl	$(9.6 \pm 6.2) \times 10^{-11}$

Data from Ref. [2]

Table 2-4. Requirement of the position 2 (leucine) side chain for biological activity.

Structure	ED ₅₀ for β -glucuronidase release (M)
For-Met-Leu-Phe-OH	$(2.9 \pm 0.3) \times 10^{-8}$
For-Met-Ac ₆ c-Phe-OH	$(2.7 \pm 0.7) \times 10^{-8}$
For-Met-Dpg-Phe-OH	$(5.7 \pm 2.3) \times 10^{-10}$
For-Met-Leu-Phe-OMe	$(4.7 \pm 1.6) \times 10^{-8}$
For-Met-Phe-Phe-OMe	$(4.6 \pm 1.3) \times 10^{-9}$
For-Met-Dpg-Phe-OMe	$(2.2 \pm 0.7) \times 10^{-9}$

Data from Ref. [6]

Ac₆c: 1-aminocyclohexanecarboxylic acid, Dpg: dipropylglycine

Table 2-5. Requirement of the position 3 carboxyl group for biological activity.

Structure	ED ₅₀ for lysozyme release (M)
For-Met-Leu-Phe-OH	$(5.5 \pm 2.2) \times 10^{-10}$
For-Met-Leu-Phe-OBzl	$(4.6 \pm 1.2) \times 10^{-11}$
For-Met-Leu-Phe-NHBzl	$(1.8 \pm 0.6) \times 10^{-11}$
For-Met-Leu-Phe-Phe-OH	$(2.7 \pm 0.9) \times 10^{-11}$
For-Met-Leu-Phe-Ile-OH	$(4.6 \pm 0.6) \times 10^{-11}$

Data from Ref. [2]

Table 2-6. Selectivity of fMLP analogs for chemotaxis and superoxide production.

Analog	Chemotaxis	Superoxide
For-Thp-Leu-Phe-OMe		×
For-Met-Leu-Ain-OMe		×
For-Thp-Leu- Δ^Z Phe-OMe		×
MeOCO-Met-Leu-Phe-OMe		×
Boc-Met-Leu-gPhe-COOMe		×
For-Met-Ser(Bzl)-Phe-OMe	×	
For-Met-Cys(Bzl)-Phe-OMe	×	
For-Met-Tyr(Bzl)-Phe-OMe	×	
For-Met-Lys(Z)-Phe-OMe	×	
For-Met-Leu-Ac ₆ c-Phe-OMe	×	
For-Met-Leu-Aib-Phe-OMe	×	
For-Met-Leu-Leu-Phe-OMe	×	
For-Met-Leu-Pro-Phe-OMe	×	
For-Met-Aib-Aib-Phe-OMe	×	
For-Met-Aib-Pro-Phe-OMe	×	
For-Met-Pro-Pro-Phe-OMe	×	
For-Met-Pro-Aib-Phe-OMe	×	
For-Met-Ser(For-Met-Leu-Phe)-Phe-OMe	×	
For-Met-Lys(For-Met-Leu-Phe)-Phe-OMe	×	
For-Thp-Ac ₆ c-Phe-OMe	×	
For-Met- Δ^Z Leu-Phe-OMe	×	
For-Met-Leu-Pheol-Ac	×	

Ac₆c: 1-aminocyclohexanecarboxylic acid, Ain: 2-aminoindane-2-carboxylic acid, Δ^Z Leu: (Z)-2,3-didehydroleucine, Δ^Z Phe: (Z)-2,3-didehydrophenylalanine, gPhe: *gem*-diamino-phenylalanine, Pheol: (*S*)-phenylalaninol, Thp: 4-aminotetrahydrothiopyran-4-carboxylic acid,

2-2. 光アフィニティー標識

受容体とリガンドであるペプチドの相互作用を検出する方法として、従来からペプチドの標識が行われてきた。標識の方法は、同位体元素によるものと置換基によるものに大別できる。同位体による標識方法には重水素である ^2H や ^{13}C 炭素などの安定同位体を用いる方法と、トリチウムと呼ばれる ^3H や ^{14}C 炭素などの放射性同位体を用いる方法がある。後者の放射性同位体を用いる手法は放射性同位元素標識法あるいは放射能標識法 (Radiolabeling) と呼ばれ、放射能を測定することで受容体タンパク質を検出および測定できる。この方法は標的の種類を問わず高感度に検出できるが、放射性同位体を用いるため取り扱いに注意が必要であり、実験の後処理も問題となってくる。

一方、置換基による標識法は目的に応じて様々な置換基が用いられる。中でも蛍光性を持つ置換基による蛍光標識 (Fluorescence labeling) は蛍光イムノアッセイ、蛍光抗体法など様々な生化学の分野で広く用いられている [27]。蛍光標識法は蛍光顕微鏡などによって高感度に検出することができ、蛍光標識 (蛍光プローブ) にはフルオレセインイチシオシアネート (FITC) がよく用いられる (Fig. 2-1)。また、異なる蛍光標識を組み合わせることで複数の目的タンパク質を一度に検出するマルチカラーイメージングも可能である。標識部位は主に FITC などが特異的に結合できるアミノ基が用いられるが、Maleimide 型のプローブを用いることでシステイン側鎖のチオール基も標識できる。また近年では、ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼを用いる酵素標識法も用いられる。ペルオキシダーゼがもっとも一般的なプローブであり、ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) やイムノブロットティングなどの免疫化学的手法に適している。

受容体の標識法ではアフィニティーラベルが用いられる。このア

フィニティーラベルには特定のアミノ酸残基に化合物を作用させ、構造を変化させる方法と、アフィニティーラベル試薬で修飾する方法がある。どちらの手法とも特定のアミノ酸残基、あるいは特定部位の選択的修飾が可能である。前者の方法では試薬の化学的特性から、限定したアミノ酸残基の修飾を期待する方法である。一方、後者の方法は生化学的親和性を利用した方法であり、限定部位に高効率の修飾が行える。このアフィニティーラベル試薬は親和性基部分と反応性官能基を組み合わせたデザインで、親和性基による特定部位への試薬の濃縮効果のため特異的、高効率の修飾が行える。この反応性官能基に光照射により活性となる光アフィニティープローブを用いる光親和性標識法 (Photoaffinity labeling) がある。この光アフィニティープローブにはアセトフェノン、ベンゾフェノンやベンゾフェノン様の骨格を有する化合物[28-34]、フェニルジアジリン基、フェニルアジド基をもつ化合物[35-39]、アクリジン骨格を持つ化合物が用いられている (Fig. 2-2) [40]。これらの光アフィニティープローブの中でもベンゾフェノン骨格を持つ化合物がよく用いられている。このベンゾフェノンは波長 360 nm 付近の光を照射することによりプロトンを引き抜き、数段階の光架橋反応を起こし共有結合を形成する。反応機構を以下に示す (Fig.2-3)。

第 1 段階

ベンゾフェノンに光 ($<360\text{nm}$) を照射すると酸素原子の非結合性 n 軌道の電子が一つ、カルボニル基の反結合性 π^* 軌道に昇位する。

第 2 段階

段階 1 で形成された三重項状態の diradicaloid において、電子が不足状態の酸素原子の n 軌道は電子不足状態のため求電子的であり、結合力の弱い C-H の σ 結合に攻撃し、H 原子を抜き取ることで n 軌道を半充填する。

第3段階

H 原子を取り込むことで形成されたケチルラジカルと H 原子を引き抜かれて形成されたアルキルラジカルは再結合し、ベンズピナコール型の化合物を形成し、光架橋反応が終了する。

Diradicaloid 種は幾何学的に接近できる C-H 結合に攻撃を仕掛ける。そのため反応の選択性として角度、反応面や距離 (2.5~3.1 Å) などが挙げられる。二つの不対電子を持つ三重項状態の寿命は一重項状態よりも長く、引き抜く水素がない場合 80~120 μs 持続する。しかし、適切な配向を持つ C-H 結合がある場合 100 倍ほど短くなると考えられている。H-donor の増加による寿命の減少は Stern-Volmer 式から算出できる。

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + k_2[RH] \quad (\text{Stern-Volmer 式})$$

τ_0 は RH (H-donor) が無いときの励起状態の寿命、 τ は RH (H-donor) が存在するときの励起状態の寿命、 k_2 は 2 次反応速度係数である。

実際のペプチドリガンドによる受容体の研究などには、これらの官能基をアミノ酸側鎖に持つ *p*-benzoylphenylalanine (Bpa) 残基やその誘導体、4'-[3-(trifluoromethyl)-3H-diaziridine-3-yl]phenylalanine [(Tmd)Phe] 残基がリガンドペプチドに組み込まれ、受容体との相互作用の解明に用いられている [31, 34, 41, 42]。

Wilson らは Bpa をヒドロキシル化した *p*-(4-hydroxybenzoyl)phenylalanine (HBpa) 残基を血圧降下作用や催涙、回腸収縮作用を持つ Substance P (SP; RPKPQQFFGLM-NH₂) の 8 位の Phe 残基の位置に組み込み、この HBpa の有用性を確かめている [31]。Bpa 残基は ¹²⁵I 標識を自身に同時に行なえず、他の残基に行わなければならないが、この HBpa だとこれらの事柄が可能となることを確かめている。

Hadac らは cholecystokinin (CCK) に Bpa を組み込み、結合部位の同定を行っている [41]。光架橋後、CNBr (cyanogen bromide) 分解を行うと、7 回膜貫通型受容体の第 6 膜貫通部位 (TM6) の上部から第 7 膜貫通部位 (TM7) のフラグメントが得られた。更に TM6 と TM7 を繋ぐループに変異を加え、再度 CNBr 分解を行うと TM7 のフラグメントが得られたことから、CCK の受容体結合部位は TM7 にあると判断している。

Shoelson はインスリンとインスリン受容体の相互作用解析に Bpa を用いている [42]。Bpa は受容体の認識部位であるインスリン B 鎖の 25 位の Phe^{B25} の位置に導入している。光架橋の結果、Bpa^{B25} インスリンは $\alpha 2 \beta 2$ の holoreceptor 型のインスリン受容体と光架橋していることが分かった。また、 $\alpha 2 \beta 2$ の holoreceptor は S-S 架橋で繋がっているため、S-S 架橋を還元させ、切断した条件で光架橋された受容体を検出すると $\alpha \beta$ の half-receptor として検出されている。また、この報告では光架橋のタイムコースをとっており、この系では約 20 分で最大の光架橋率 (約 60%) が得られている。この以上に述べてきたようにアミノ酸側鎖に光アフィニティー標識を持つ Bpa 残基などは受容体とリガンドの相互作用機構の解析に有用であると考えられるため、本研究では Bpa 残基を導入した一連の fMLP アナログを用い、FPR との相互作用機構の解析を検討した。

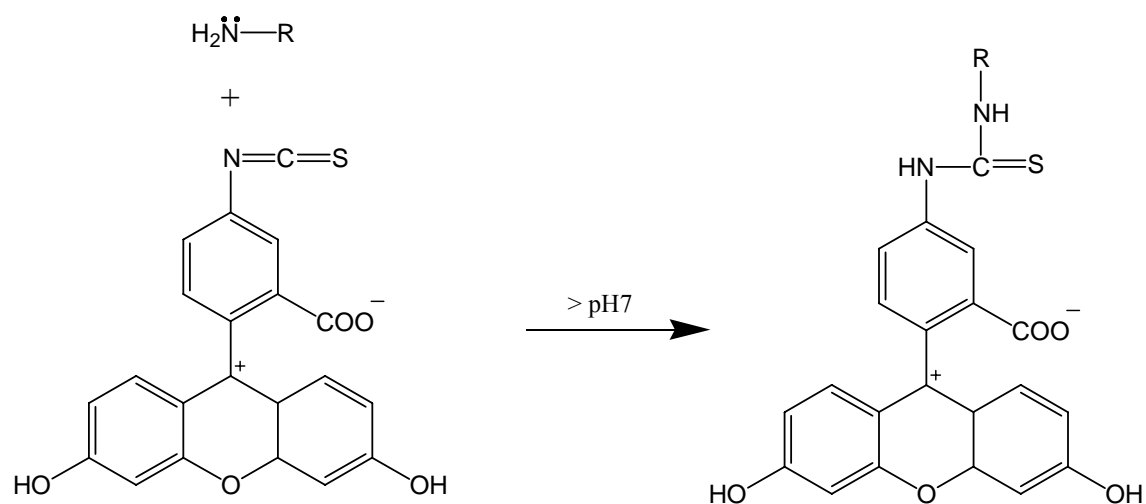


Fig. 2-1. Reaction of FITC to amino group.

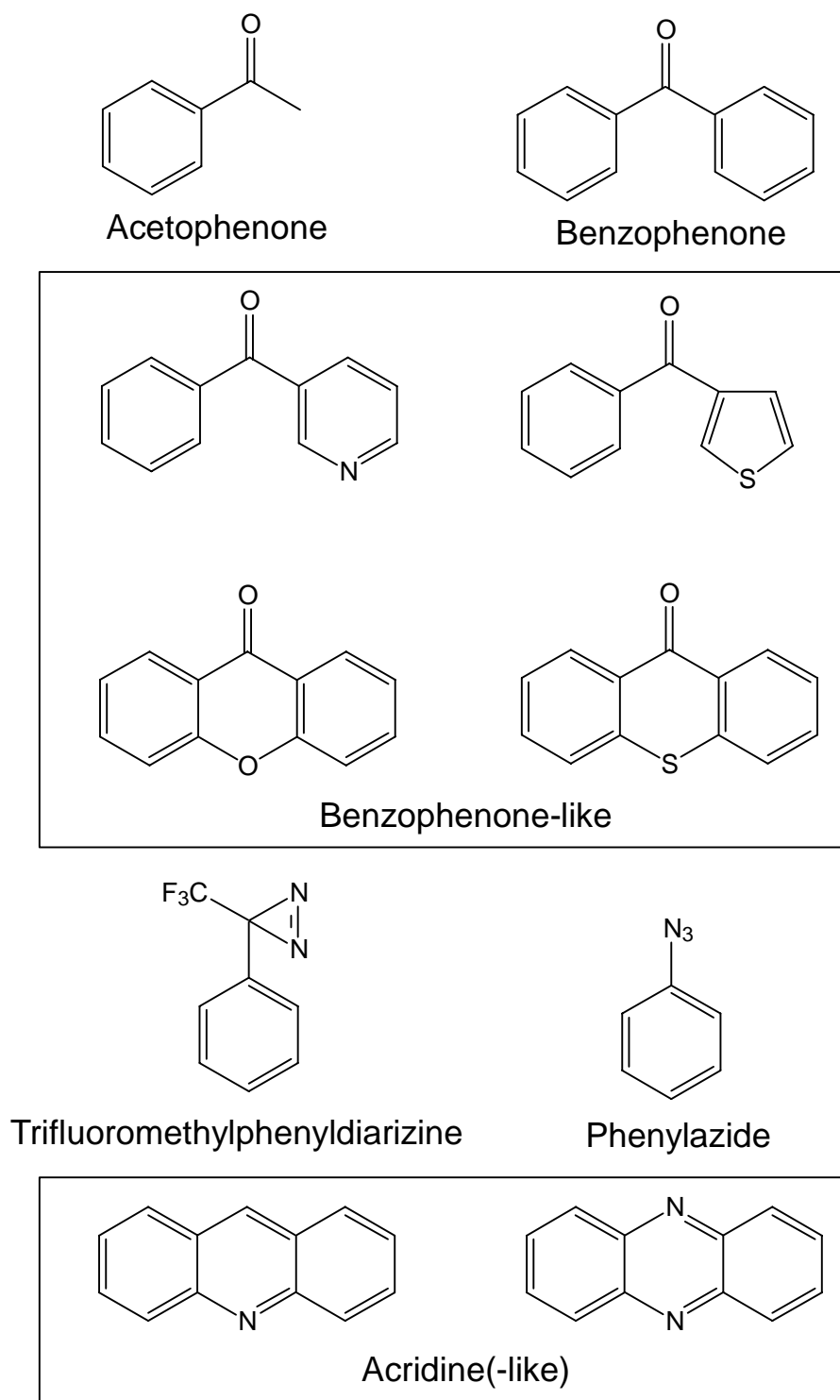


Fig. 2-2. Structure of several photoaffinity probes.

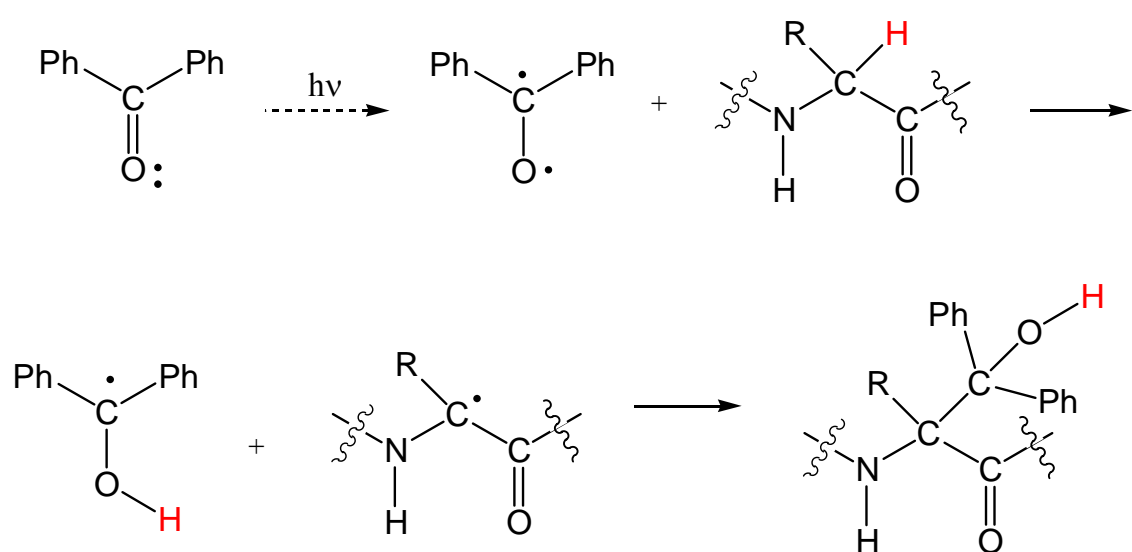


Fig. 2-3. Reaction mechanism of benzophenone photophore.

2-3. fMLP アナログのデザイン

本研究では fMLP と FPR の相互作用を解析する手法を確立するため、二箇所アフィニティー標識をした一連の fMLP アナログをデザイン、合成した。デザインアナログの構造は Fig. 2-4 に示す。一つ目の標識には光アフィニティープローブとして、アミノ酸側鎖にベンゾイル基を持つ *p*-benzoylphenylalanine (Bpa) 残基を用いた (Fig. 2-5)。二つ目には酵素標識プローブとしてビオチン残基を導入した。Bpa 残基は光照射によって FPR のリガンド結合部位と光架橋し、fMLP アナログ - FPR 複合体を強固に形成させる目的で導入した。ビオチン残基は fMLP アナログ - FPR 複合体を、アビジンを用いたウェスタンブロット法で検出する際の標識として導入した。Biotin-avidin の相互作用は広く生化学の研究で用いられる相互作用である。

デザインアナログの配列は“2-1. 構造活性相関”で述べた事柄を基に決定した。まず、デザインアナログの N 端には fMLP の活性維持に必要なホルミル基を導入した。1 位には活性維持に必須な Met 残基を導入した。2 位は比較的大きな疎水性残基の置換が許容されるが Leu 残基をそのまま導入した。3 位の Phe 残基は fMLP の活性維持に必要なため、この位置も置換を行わなかった。4 位は芳香族の側鎖を持つ残基を導入しても活性の減少しないため、この位置に Bpa 残基を導入した。

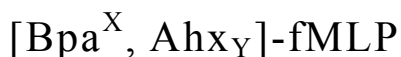
二つ目の標識であるビオチン残基は FPR の中に埋もれていると標識として用いることができない。そのため、スペーサーを導入することによりこの問題を回避しようと試みた。スペーサーには 5 個のメチレン鎖を有する ϵ -aminohexanoic acid (Ahx) 残基を用いた。Fabbri らは蛍光ラベルしたアナログによって FPR の結合部位は 6 ~ 8 残基あると見積もっている [43]。そのためビオチンプローブを結合部位の外に出すためスペーサーの数は 0, 1, 2 個と変化させた。

ここまで疎水性のアミノ酸残基ばかり導入しており、実験に用い

る際、水溶液へ溶解しないのではないかと考えられた。そこで最も親水性の残基である Arg 残基を二つ導入した。ビオチン残基はメチレン鎖の先端にカルボキシル基を有する構造のため、アミノ基に結合させることができる。そのため側鎖にアミノ基を有し、更に親水性が高い Lys を導入した。ビオチン残基は側鎖のεアミノ基に結合させた。これらのアナログの C 端もできるだけ水溶液への溶解度を高めるため、アミド体とした。

また、光アフィニティープローブである Bpa 残基の位置が光架橋反応に与える影響を検討するため、Bpa 残基の位置をずらしたアナログをデザインした。Bpa 残基の導入部分を検討したところ、2 位の Leu 残基の位置が比較的大きな疎水性残基の置換が許容されるため、この位置に導入した。4 位から Bpa 残基を移動させたため、この位置には最も構造が類似した Phe 残基を導入した。スペーサーの長さは今回のデザインペプチドの中で最長の 2 個とした。

本研究で用いた一連の fMLP アナログは Bpa 残基の位置及びスペーサーの数が異なるため、下記に示す命名を行った。以降、この名称を用いて fMLP アナログを表すことにする。



X: Bpa 残基の位置 Y: スペーサーの数

[Bpa ⁴ ,Ahx ₀]-fMLP	For-Met-Leu-Phe-Bpa-Arg-Arg-Lys(ϵ -biotin)-NH ₂
[Bpa ⁴ ,Ahx ₁]-fMLP	For-Met-Leu-Phe-Bpa-Ahx-Arg-Arg-Lys(ϵ -biotin)-NH ₂
[Bpa ⁴ ,Ahx ₂]-fMLP	For-Met-Leu-Phe-Bpa-Ahx-Ahx-Arg-Arg-Lys(ϵ -biotin)-NH ₂
[Bpa ² ,Ahx ₂]-fMLP	For-Met-Bpa-Phe-Phe-Ahx-Ahx-Arg-Arg-Lys(ϵ -biotin)-NH ₂

Fig. 2-4. Structure of designed peptides.

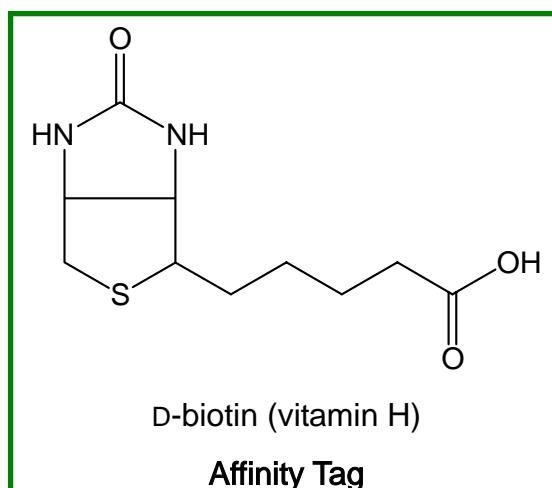
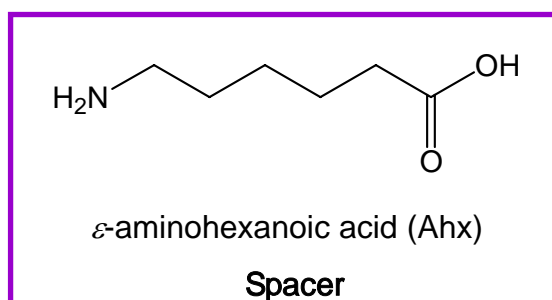
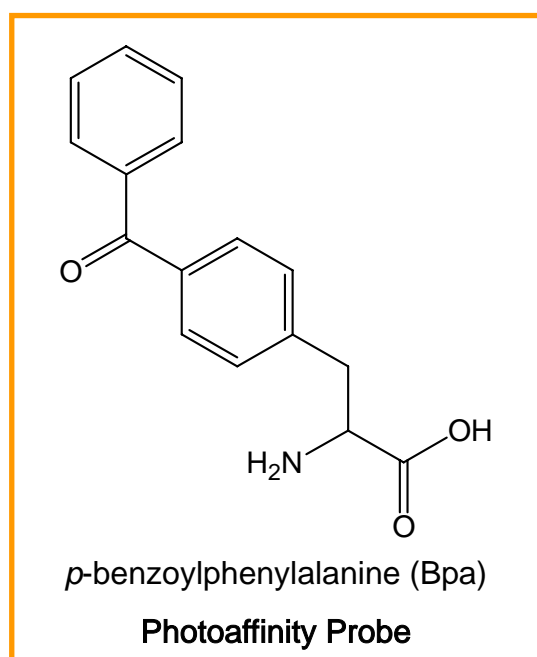


Fig. 2-5. Functional residues in designed peptide.

2-4. 固相法によるペプチドの合成

デザインしたペプチドは Fmoc 固相合成法によって合成した。固相法とはポリマーの樹脂担体上でペプチド鎖を伸長する方法である。古くからペプチドの合成に用いられている液相法と比べ、ペプチドを迅速に合成できるといった利点がある。合成に用いるポリマー樹脂は合成途中でペプチド鎖を安定に合成でき、合成条件下ではペプチド鎖が切断されず、合成終了時にはペプチド鎖を容易に切断できるといった特徴を有さなければならない。そのため、現在までに多くのポリマー樹脂が合成目的別に開発され、市販されている。

デザインペプチドは Lys 残基の側鎖にビオチン残基を導入するため、Lys 残基の二つのアミノ基は別の保護基で保護している必要がある。N 端のアミノ基はピペリジンなどの塩基性試薬で選択的に除去できる 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc)基を用いた。側鎖のεアミノ基は TFA などの酸性試薬で容易に除去できる *tert*-butyloxycarbonyl (Boc)基を用いた。また、導入するアミノ酸はすべて N 端のアミノ基を Fmoc 基で保護して、縮合反応に用いることとした。以上のことから本実験では、ピペリジン処理、TFA 処理を行っても、ペプチド鎖を安定に樹脂に固定できるポリマー樹脂が望まれる。そのため本実験では Novabiochem 社の 4-methylbenzhydrylamine (MBHA)樹脂を用いた。この樹脂はピペリジン処理、TFA 処理に対して安定であり、合成終了後のペプチド鎖の切り出しは HF やトリフルオロメタンスルホン酸 (TFMSA) といった強力な酸によって行うことができる。

保護アミノ酸の縮合反応に用いるカップリング試薬には、ウロニウム系の 2-(1H-9-benzotriazole-1-yl)-1, 1, 3, 3,-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) や HBTU を改良し、より縮合反応を進行させやすくした 2-(1H-9-benzotriazole-1-yl)-1, 1, 3, 3,-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU) と、従来から広く使用されてい

るカルボジイミド系の *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC)や *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIPCI)、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)などがある。ウロニウム系の試薬は迅速に反応が進行するが、比較的高価であり、カルボジイミド系の試薬は安価であるがウロニウム系の試薬と比較し反応速度は劣る。デザインペプチドは導入が困難だと思われる配列を含んでいないため、カルボジイミド系のカップリング試薬を用いることにした。カルボジイミド系のカップリング試薬は反応副生成物として、尿素誘導体を形成する。DCC の場合は不溶性の尿素誘導体を、DIPCI の場合は親油性の尿素誘導体を、EDC の場合は親水性の尿素誘導体を形成する。そのため、本研究では DIPCI をカップリング試薬に用いた。

Fmoc アミノ酸はペプチド研究所 (Osaka, Japan) から購入したものを用いた。Fmoc-Bpa-OH は渡辺化学 (株) (Hiroshima, Japan) から、MBHA resin、Fmoc- ϵ Ahx は Novabiochem (San Diego, CA, USA)、D-biotin は和光純薬工業 (株) (Osaka, Japan) から購入した。他のペプチド合成用試薬もペプチド合成用あるいはもっとも純度の高いものを用いた。ペプチドの合成は東京理科器械 (株) (Tokyo, Japan) の Solid Phase Organic Synthesizer CCS-600R を用いて行った (Fig. 2-6)。

Fmoc アミノ酸はカップリングに用いる際、あらかじめ活性化させておいた。活性化方法：Fmoc アミノ酸 (resin に対し 10 eq.)、HOBT (12 eq.)、DIPCI (11 eq.) を NMP (2 ml) に溶かし、30 分待つ。

実験操作

1. MBHA 樹脂を反応容器に入れ、DMF (1 分)、ジクロロメタン (90 分) で膨潤させた。
2. Fmoc-Lys(Boc)-OH をカップリングさせた (1 時間)。
3. TFA を加え、側鎖 Boc 基を除去した (1 分、5 分)。
4. DMF で 5 回 (各 10 秒) 洗浄させた後、10% DIEA/NMP で 5 回 (各 1 分) TFA を中和させた。

5. DMSO/NMP (2/1, v/v)に溶解させ活性化させておいた D-biotin をカップリングさせた (1 時間)。
6. DMSO/DMF (1/1, v/v)で 5 回 (各 1 分) 洗浄させた。
7. 50% Piperidine/NMP で Fmoc 基を除去させた (1 分, 5 分)。
8. DMF で 10 回 (各 10 秒) 洗浄させた。
9. Fmoc アミノ酸をカップリングさせた (1 時間)。ただし Fmoc-Bpa の縮合は 3 時間行った。
10. DMF で 5 回 (各 10 秒) 洗浄させ、カイザーテストにより縮合が完了していることを確認した。
11. 操作 7~10 を繰り返し 1 位 Met 残基まで縮合させた。
12. HCO-ONSu(10 eq.)でホルミル化を行った (1 時間)。
13. DMF で 5 回 (各 10 秒) 洗浄させた後、MeOH で 10 回 (各 1 分) 洗浄し、デシケーター中で乾燥させた。
14. TFA (5 ml)/EDT (250 μ l)/thioanisole(500 μ l)/TFMSA(500 μ l)の混合液でペプチド鎖を樹脂から切り出した (90 分)。
15. 遠心管に溶液を集め、ジイソプロピルエーテルで 50 ml にし、ペプチドを析出させ、遠心分離させた (3000 rpm, 5 分間)。
16. ジイソプロピルエーテルで 3 回デンカンテーションした。

樹脂から切り出したペプチドは BIO-RAD Laboratory 社 (Hercules, CA, USA) の Bio-Gel P-2 (range: 100-1800 Da) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーで精製した。5% AcOH で溶出させた各フラクションを UV 測定 (220 nm) し、目的のフラクションを集め、トミー精工 (株) (Tokyo, Japan) の Centrifugal Concentrator CC-105 を用いて遠心濃縮した。

ペプチドの純度は PerkinElmer 社 (Wellesley, MA, USA) の HPLC 装置で確認した。カラムは和光純薬 (株) の Wakosil C-18AR column を用い、水 - アセトニトリルのグラジエントで測定した。いずれのアナログとも純度は 80~90% であり、溶出時間の短い所にピークが観測された。

ペプチドの同定は MALDI-TOF MS で行った。測定は PerSeptive Biosystems 社 (Foster City, CA, USA) の Voyager DERF で行い、マトリックスは同社の α - シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸 (α -CHCA) を使用した。測定結果を Table 2-7 にまとめる。いずれのアナログとも $[M+Na]^+$ のピークが観測でき、計算値にほぼ一致する結果が得られた。また、スペクトル中には HPLC 測定で溶出時間の短いところに確認された化合物のピークも観測された (Fig. 2-7)。このピークは解析の結果、ホルミル化されていない化合物であることが示唆された。

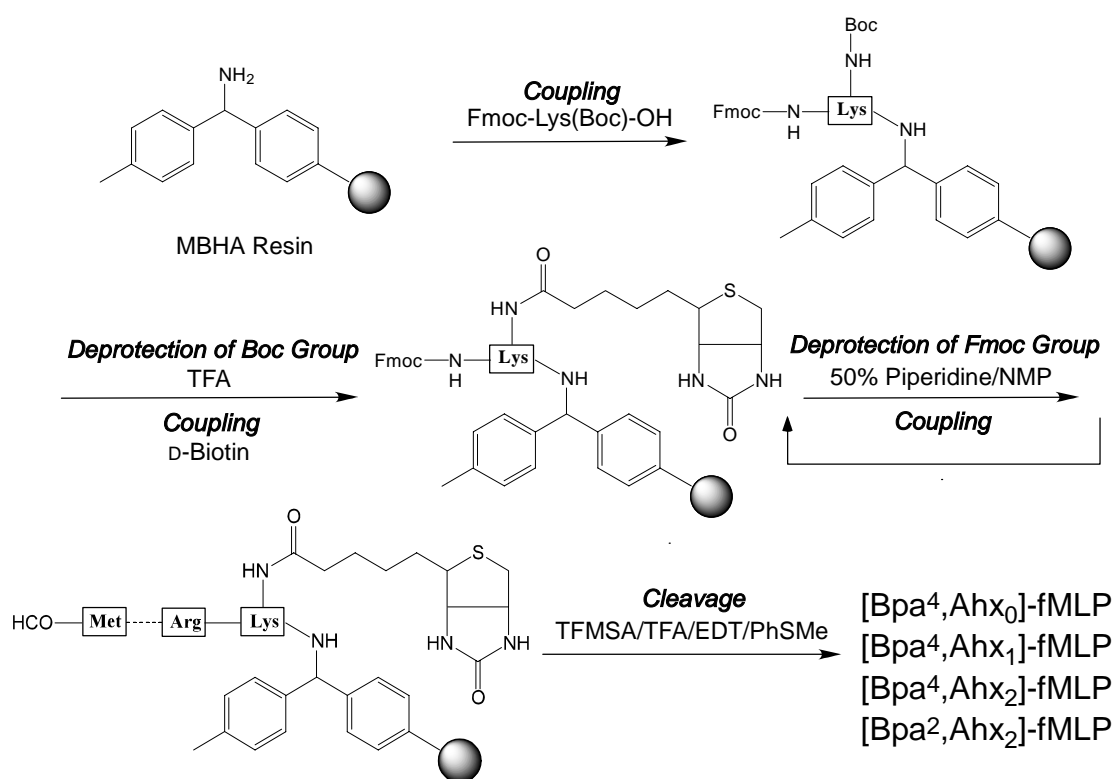


Fig. 2-6. Solid phase synthesis of designed peptide.

Table 2-7. Results of MALDI-TOF MS analyses.

Analog	Calcd. Mass (m/z)	Found Mass (m/z)
[Bpa ⁴ , Ahx ₀]fMLP	1354.6	1376.3
[Bpa ⁴ , Ahx ₁]fMLP	1467.7	1489.5
[Bpa ⁴ , Ahx ₂]fMLP	1580.9	1602.1
[Bpa ² , Ahx ₂]fMLP	1614.9	1636.4

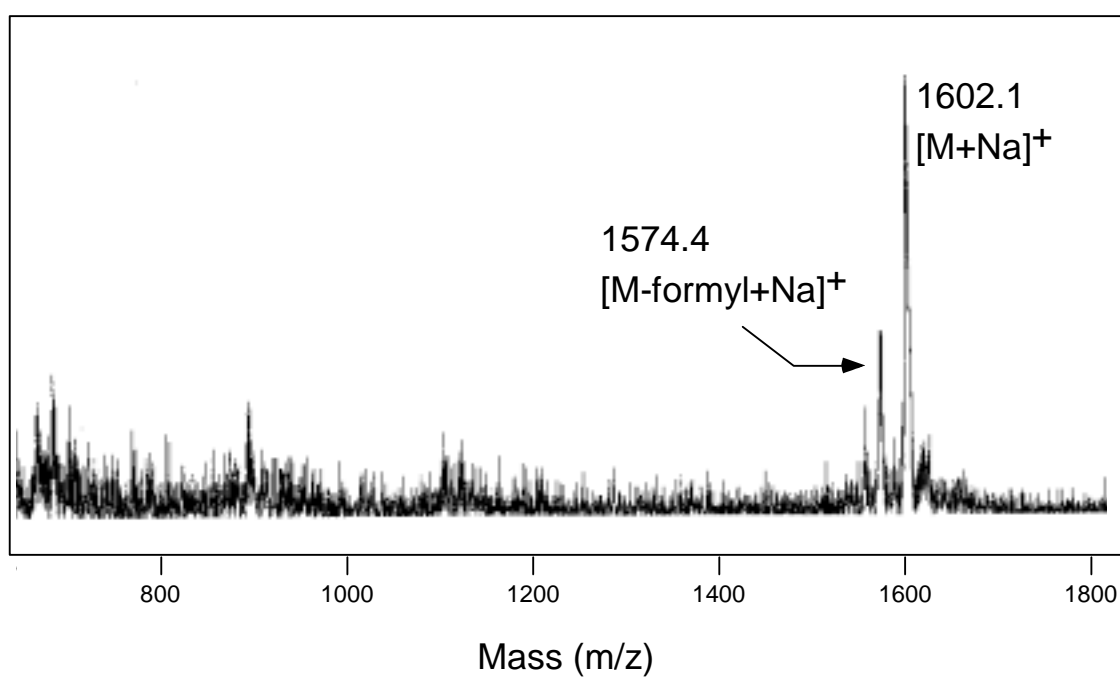


Fig. 2-7. MALDI-TOF MS spectrum of [Bpa⁴, Ahx₂]-fMLP

2-5. 参考文献

- [1] Freer, R.J., Day, A.R., Radding, J.A., Schiffmann, E., Aswankumar, S., Showell, H.J. and Becker, E.L. (1980) *Biochemistry*, **19**, 2404-2410.
- [2] Freer, R.J., Day, A.R., Muthukumaraswamy, N., Pinon, D., Wu, A., Showell, H.J. and Becker, E.L. (1982) *Biochemistry*, **21**, 257-263.
- [3] Marasco, W.A., Showell, H.J., Freer, R.J. and Becker, E.L. (1982) *J. Immunol.*, **128**, 956-962.
- [4] Becker, E.L. (1987) *Am. J. Pathol.*, **129**, 16-24.
- [5] Toniolo, C., Crisma, M., Valle, G., Bonora, G.M., Polinelli, S., Becker, E.L., Freer, R.J., Sudhanand, Rao, R.B., Balaram, P. and Skumar, M. (1989) *Peptide Res.*, **2**, 275-281.
- [6] Dentino, A.R., Raj, P.A., Nardin, E.D. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.*, **337**, 267-274.
- [7] Spisani, S., Traniello, S., Giuliani, A.L., Torrini, I., Pagani-Zecchini, G., Paglialunga-Paradisi, M., Gavuzzo, E., Mazza, F., Pochetti, G. and Lucente, G. (1992) *Biochem. Int.*, **26**, 1125-1135.
- [8] Pagani-Zecchini, G., Paglialunga-Paradisi, M., Torrini, I., Lucente, G., Gavuzzo, E., Mazza, F., Pochetti, G., Paci, M., Sette, M., Di-Nola, A., Veglia, G., Traniello, S. and Spisani, S. (1993) *Biopolymers*, **33**, 437-451.
- [9] Miyazaki, M., Kodama, H., Fujita, I., Hamasaki, Y., Miyazaki, S. and Kondo, M. (1995) *J. Biochem.*, **117**, 489-494.
- [10] Miyazaki, M., Kodama, H., Fujita, I., Hamasaki, Y., Miyazaki, S. and Kondo, M. (1995) *Peptide Chemistry 1994*, Protein Research Foundation, Osaka, Japan, 293-296.
- [11] Derian, C.K., Solomon, H.F., Higgins, J.D., Beblavy, M.J., Santulli, R.J., Bridger, G.J., Pike, M.C., Kroon, D.J. and Fischman, A.J. (1996) *Biochemistry*, **35**, 1265-1269.
- [12] Torrini, I., Mastropietro, G., Zecchini, G.P., Paradisi, M.P., Lucente,

- G. and Spisani, S. (1998) *Arch. Pharm.*, **331**, 170-176.
- [13] Yoshiki, M., Asai, D., Kodama, H., Miyazaki, M., Fujita, I., Hamasaki, Y., Miyazaki, S. and Kondo, M. (2001) *Peptide Science 2000*, The Japanese Peptide Society, Osaka, Japan, 171-174.
- [14] Gao, J.L., Becker, E.L., Freer, R.J., Muthukumaraswamy, N. and Murphy, P.M. (1994) *J. Exp. Med.*, **180**, 2191-2197.
- [15] Su, S.B., Gong, W., Gao, J.-L., Shen, W., Murphy, P.M., Oppenheim, J.J. and Wang, J.M. (1999) *J. Exp. Med.*, **189**, 395-402.
- [16] Hu, J.Y., Le, Y., Gong, W., Dunlop, N.M., Gao, J.L., Murphy, P.M. and Wang, J.M. (2001) *J. Leukoc. Biol.*, **70**, 155-161.
- [17] Le, Y., Oppenheim, J.J. and Wang, J.M. (2001) *Cytokine Growth Factor Rev.*, **12**, 91-105.
- [18] Le, Y., Murphy, P.M. and Wang, J.M. (2002) *Trends Immunol.*, **23**, 541-548.
- [19] Ferretti, M.E., Nalli, M., Biondi, C., Colamussi, M.L., Pavan, B., Traniello, S. and Spisani, S. (2001) *Cell. Signal.*, **13**, 233-240.
- [20]
- [21] Zecchini, G.P., Paradisi, M.P., Torrini, I., Nalli, M., Lucente, G. and Spisani, S. (2000) *Farmaco.*, **55**, 308-313.
- [22] Cavicchioni, G., Turchetti, M. and Spisani, S. (2002) *J. Pept. Res.*, **60**, 223-231.
- [23] Cavicchioni, G. and Spisani, S. (2001) *J. Pept. Res.*, **58**, 257-262.
- [24] Cavicchioni, G., Varani, K., Niccoli, S., Rizzuti, O. and Spisani, S. (1999) *J. Pept. Res.*, **54**, 336-343.
- [25] Cavicchioni, G., Turchetti, M. and Spisani, S. (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 3157-3159.
- [26] Torrini, I., Zecchini, G.P., Paradisi, M.P., Lucente, G., Mastropietro, G., Gavuzzo, E., Mazza, F., Pochetti, G., Traniello, S. and Spisani, S. (1996) *Biopolymers*, **39**, 327-337.
- [27] 木下一彦、御橋廣真 編「蛍光測定 生物化学への応用」(学会

出版センター) 1983.

- [28] Prestwich, G.D., Dormán, G., Elliott, J.T., Marecak, D.M. and Chaudhary, A. (1997) *Photochem. Photobiol.*, **65**, 222-234.
- [29] Dormán, G. and Prestwich, G.D. (1994) *Biochemistry*, **33**, 5661-5673.
- [30] Boscá, F. and Miranda, M.A. (1998) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **43**, 1-26.
- [31] Wilson, C.J., Husain, S.S., Stimson, E.R., Dangott, L.J., Miller, K.J. and Maggio, J.E. (1997) *Biochemistry*, **36**, 4542-4551.
- [32] Miller, W.T. and Kaiser, E.T. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5429-5433.
- [33] O'Neil, K.T., Erickson-Viitanen, S. and DeGrado, W.F. (1989) *J. Biol. Ghem.*, **264**, 14571-14578.
- [34] Kauer, J.C., Erickson-Viitanen, S., Wolfe, H.R. Jr, and DeGrado, W.F. (1986) *J. Biol. Ghem.*, **261**, 10695-10700.
- [35] Hosoya, T., Aoyama, H., Ikemoto, T., Hiramatsu, T., Kihara, Y., Endo, M. and Suzuki, M. (2002) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3263-3265.
- [36] Sugimoto, T., Fujii, T., Hatanaka, Y., Yamamura, S. and Ueda, M. (2002) *Tetrahedron Lett.*, **43**, 6529-6532.
- [37] Bettio, A. and Beck-Sickinger, A.G. (2001) *Biopolymers*, **60**, 420-437.
- [38] Poland, A., Glover, E., Ebetino, F.H. and Kendo, A.S. (1986) *J. Biol. Ghem.*, **261**, 6352-6365.
- [39] Kessler, B., Michielin, O., Blamchard, C.L., Apostolou, I., Delarbre, C., Gachelin, G., Grégoire, C., Malissen, B., Cerottini, J.-C., Wurm, F., Karplus, M. and Luescher, I. (1999) *J. Biol. Ghem.*, **274**, 3622-3631.
- [40] Batra, S.P. and Nicholson, B.H. (1982) *Biochem. J.*, **207**, 101-108.
- [41] Hadac, E.M., Pinon, D.I., Ji, Z., Holicky, E.L., Henne, R.M., Lybrand, T.P. and Miller, L.J. (1998) *J. Biol. Ghem.*, **273**, 12988-12993.
- [42] Shoelson, S.E., Lee, J., Lynch, C.S., Backer, J.M. and Pilch, P.F.

(1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 4085-4091.

[43] Fabbri, E., Spisani, S., Biondi, C., Barbin, L., Colamussi, M.L., Cariani, A., Traniello, S., Torrini, I. and Ferretti, M.E. (1997) *Biochem. Biophys. Acta*, **1359**, 233-240.

第 3 章

Biological Activity of Synthetic fMLP Analogs and Cross-linking of Formyl-peptide Receptors

fMLP アナログの生理活性と 受容体の光架橋

この章では2章で合成した fMLP アナログを使って生理活性評価をし、光架橋によって標的の FPR の検出を試みたことについて述べていく。

3-1. 血球分離

まず始めに、生理活性評価を行うために使用したヒト好中球溶液の調製方法について述べる。試料調製の際に使用した Dextran T-500 と Ficoll-paque は Amersham Biosciences 社 (Uppsala, Sweden) から購入したものをを用いた。

実験操作

17. ボランティアのヒト静脈末梢血を 3% Dextran/生理食塩水 (0.9% NaCl 水溶液) と 1:1 の比率で混合させ 30 分静置し、赤血球を沈殿させた。
18. 上澄みを 1,500 rpm で 5 分間遠心分離した。
19. 残渣に超純水を加え 45 秒攪拌した後、1.8% NaCl aq. soln. を加え生理食塩水濃度 (0.9%) に戻した。
20. 溶液を 1,500 rpm で 5 分間遠心分離した。この段階で明らかに赤血球が残存・混入している場合、同様の操作を繰り返した。
21. PBS を加え、1,500 rpm で 5 分間遠心分離し洗浄した。
22. Ficoll-paque (2ml) に、洗浄し PBS に懸濁させた細胞溶液を上乗せさせた後、3,000 rpm で 30 分間遠心分離し、好中球を単離した。
23. 単離させた好中球数を顕微鏡上で Bürker-Türk 式血球計算板を用いてカウントした。このとき少なくとも4箇所以上の場所から得られた値を平均して好中球数を見積もった。

3-2. 遊走活性

FPR によって引き起こされる生理活性の一つに、走化性因子に感知し炎症部位へ移動する遊走活性がある。ここでは合成した fMLP アナログの遊走活性能を Micro Chemotaxis チャンバーを用いて測定した[1]。

測定に用いた Diff-Quick 溶液は国際試薬（株）社（Kobe, Japan）から購入したものを使用した。また検出装置は BIO-RAD Laboratory 社（Hercules, CA, USA）の Model 450 Microplate Reader を用いた。

実験操作

1. 好中球を 1 mM CaCl_2 , 5 mM D-glucose, 5 mM MgCl_2 を含む PBS に懸濁させ、濃度を 1×10^6 cells/ml に調整した。
2. サンプル溶液をチャンバーの下段のウェルに満たした。
3. Polyvinylpyrrolidone-free のポリカーボネートフィルターを用いてチャンバーを組み立て、上段のウェルに好中球浮遊液を加えた。
4. 95% CO_2 条件下 37°C でインキュベートした（90 分）。
5. ポリカーボネートフィルターを Diff-Quick 溶液で染色し、マイクロプレートリーダーで 595 nm の吸光度を測定した。

fMLP アナログの遊走活性測定の結果を Fig. 3-1.に示す。Ahx スペーサーの短いアナログである $[\text{Bpa}^4, \text{Ahx}_0]\text{-fMLP}$ 、 $[\text{Bpa}^4, \text{Ahx}_1]\text{-fMLP}$ は遊走活性を示さなかった。一方、二つの Ahx スペーサーをもつ $[\text{Bpa}^4, \text{Ahx}_2]\text{-fMLP}$ 、 $[\text{Bpa}^2, \text{Ahx}_2]\text{-fMLP}$ では明確な差が現れた。 $[\text{Bpa}^4, \text{Ahx}_2]\text{-fMLP}$ は 10^{-5} M で fMLP に匹敵する遊走活性を示した。これに対し、 $[\text{Bpa}^2, \text{Ahx}_2]\text{-fMLP}$ は同じ濃度でも遊走活性を示さなかった。これらの結果から、4 位に Bpa を導入したアナログでは遊走活性を示すためには、少なくとも 2 つの Ahx スペーサーが必要であることが

示唆された。また、Bpa の導入位置を変化させた $[\text{Bpa}^4, \text{Ahx}_2]\text{-fMLP}$ と $[\text{Bpa}^2, \text{Ahx}_2]\text{-fMLP}$ を比較すると、 $[\text{Bpa}^4, \text{Ahx}_2]\text{-fMLP}$ のみ遊走活性をしており、Bpa の導入位置が生理活性に影響を与えることが考えられた。

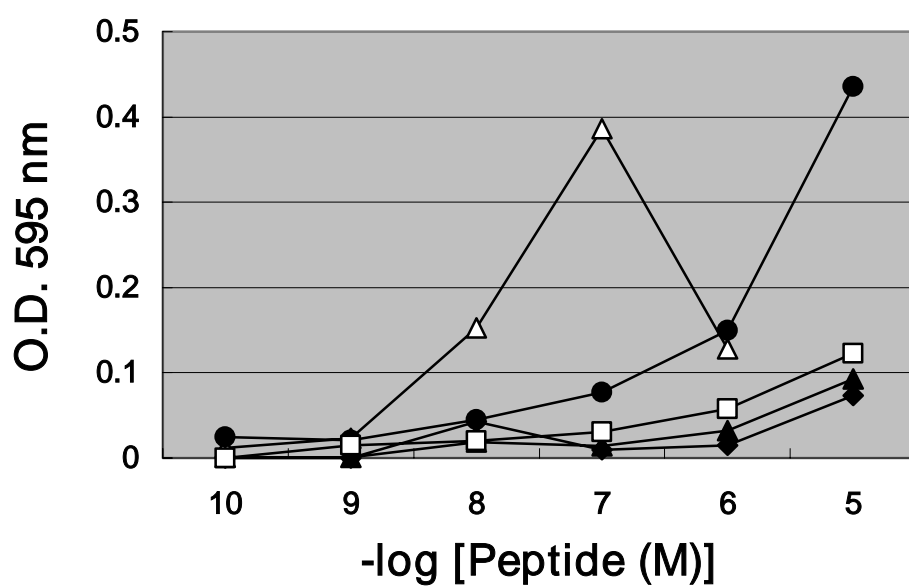


Fig. 3-1. Chemotactic index of fMLP (Δ), [Bpa⁴,Ahx₀]-fMLP (\blacklozenge), [Bpa⁴,Ahx₁]-fMLP (\blacktriangle), [Bpa⁴,Ahx₂]-fMLP (\bullet) and [Bpa²,Ahx₂]-fMLP (\square) for human neutrophils.

3-3. 活性酸素産生

FPR によって引き起こされる生理活性の一つに、殺菌作用を持つ活性酸素を産生する機能がある。ここでは合成した fMLP アナログの活性酸素産生能を ferricytochrome C の還元を用い、superoxide dismutase を阻害して評価した[2]。これは下記の反応式に基づく反応である。還元は島津製作所 (Kyoto, Japan) の UV-3000 dual-wavelength spectrophotometer を用いてモニターした。cytochrome C は Sigma 社 (St. Louis, MO, USA) のものを用いた。



実験操作

1. 1 mM CaCl₂, 5 mM D-glucose, 20 mM ferricytochrome C を含む細胞懸濁液を 37°C でインキュベートした。
2. 測定サンプルで 15 分刺激し、540-550 nm の吸光度を測定した。

O₂⁻ はモル吸光係数 ($19.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) から計算した。fMLP アナログの活性酸素産生能の結果を Fig. 3-2. に示す。Ahx スペーサーの短いアナログである [Bpa⁴, Ahx₀]-fMLP、[Bpa⁴, Ahx₁]-fMLP は全く活性を示さなかった。一方、二つの Ahx スペーサーをもつ [Bpa⁴, Ahx₂]-fMLP、[Bpa², Ahx₂]-fMLP は fMLP よりも強い活性を示した。これらの結果から少なくとも二つの Ahx スペーサーが活性酸素産生に必要であることが示唆された。また、同じ長さのスペーサーを持つ [Bpa⁴, Ahx₂]-fMLP、[Bpa², Ahx₂]-fMLP の間には明確な差は観測できず、同等の親和力で受容体と相互作用しているのではないかと考えられた。Fabbri らは立体制約アミノ酸を組み込んだ [Thp¹, Ain³]-fMLP、[ΔLeu²]-fMLP の 2 種の fMLP アナログを用いて生理活性を評価している[3]。その結果、[Thp¹, Ain³]-fMLP アナログは遊走活性のみ活性

を示し、 $[\Delta\text{Leu}^2]$ -fMLP アナログは活性酸素産生能のみ示し、遊走活性を持たないことが示されている。また、2位の L-Leu 残基を D-Leu 残基に置換しても活性酸素産生能のみ示し、遊走活性を持たないことが示されている。これらの結果は $[\text{Bpa}^2, \text{Ahx}_2]$ -fMLP が活性酸素産生能のみ示した本研究結果とよく一致している。これらのことから fMLP アナログの2位の位置にかさ高い Bpa 残基を導入することによって、どの生理活性を示すかを選択できる可能性を持つことが示された。

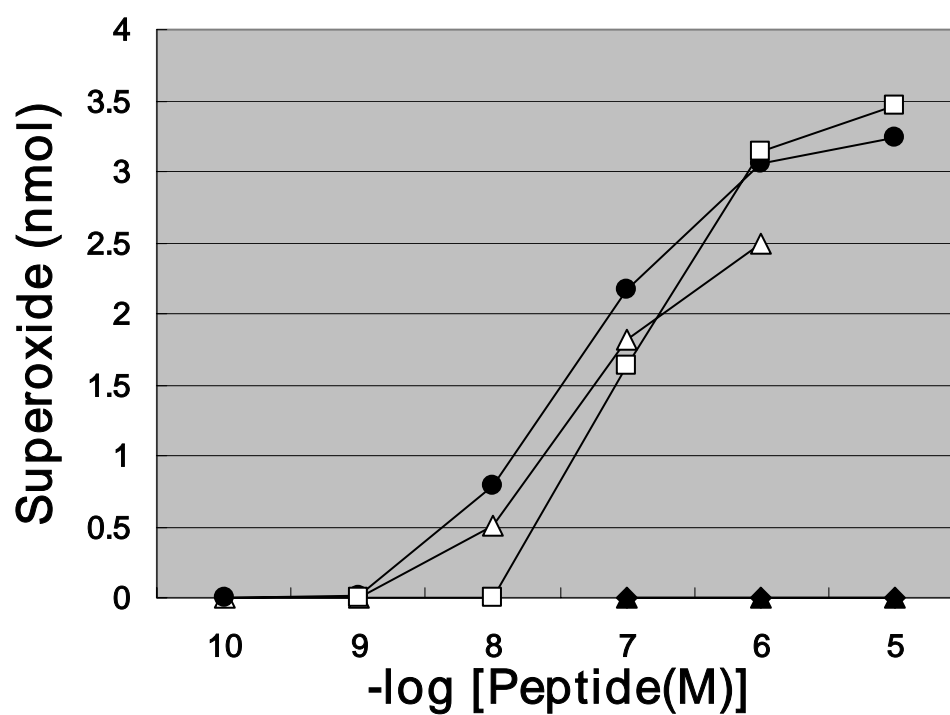


Fig. 3-2. Superoxide production of neutrophils induced by fMLP (△), [Bpa⁴,Ahx₀]-fMLP (◆), [Bpa⁴,Ahx₁]-fMLP (▲), [Bpa⁴,Ahx₂]-fMLP (●) and [Bpa²,Ahx₂]-fMLP (□).

3-4. 光架橋実験

光架橋実験は(1)UV 光照射による fMLP アナログと FPR の光架橋 (Cross-linking)、(2) Protein Assay による全タンパク質濃度の算出、(3) SDS-PAGE によるタンパク質の分離、(4) Western Blotting による標的にした FPR の検出の 4 つの実験からなる。ここではそれぞれの実験を別々のパートに分けて述べていく。

3-4-1. Cross-linking

実験に使用した Complete protease inhibitor cocktail tablet (PI)は Roche Diagnostics 社(Basel, Switzerland)から購入したものを用いた。ほかの試薬も十分に純度の高いものを用いた。Cross-linking に用いた UV ランプはコスモ・バイオ(株)社(Tokyo, Japan)の CSL-30A (使用管球 2 × 15 W ; 波長 365 nm ; 強度 2300 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) である。

実験操作

この実験はすべて 4°C の実験条件下で行った。

1. 96 ウェルマイクロプレート中の各ウェルに 1.0×10^7 cells/ml 好中球溶液 (240 μl)、 10^{-5} M fMLP (30 μl)、 10^{-5} M fMLP アナログ (30 μl) 加えた。
2. 氷冷下で 10 分インキュベートした。
3. UV ランプを用いて UV 光 (365 nm) を照射し、Cross-linking させた。
4. 溶液をマイクロチューブに集め、1,500 rpm で 10 分間遠心分離した。
5. 冷却した PBS-PI (300 μl) で 2 回洗浄した。
6. 残渣に Lysis buffer-PI (50 mM HEPES, 100 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 4 mM EDTA, 2 mM Na_3VO_4 , 2 mM PMSF, 1% Triton X-100, Complete protease inhibitor) (100 μl) を加えた。

7. 1 時間インキュベートし、受容体を可溶化させた。
8. 15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、不溶解性の部分と分離した。
9. 上澄み液を Protein Assay につけ、全タンパク濃度を決定した。
Protein Assay の方法は 3-4-2 で述べる。

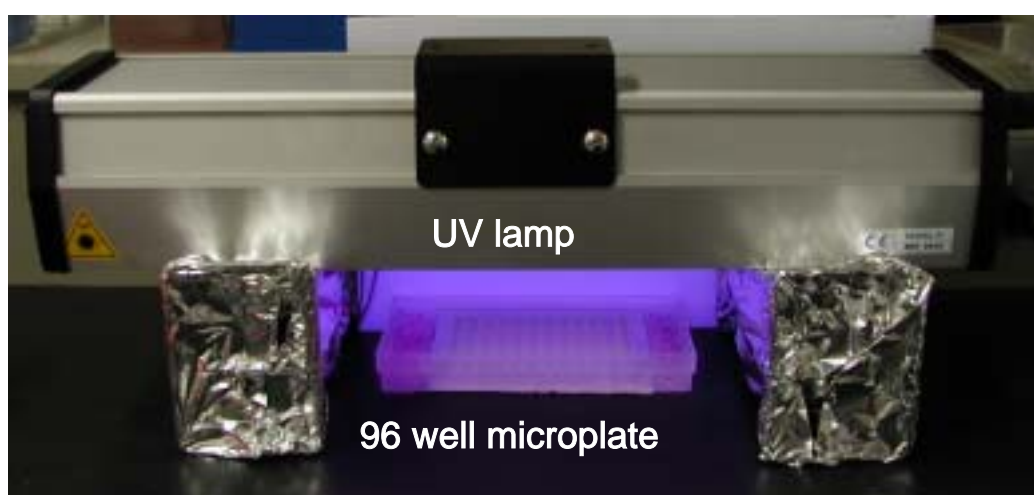


Fig. 3-3. Apparatus of Cross-linking Experiments.

3-4-2. Protein Assay

電気泳動に用いる試料のタンパク質濃度を決定するために Protein Assay を行った。一般に用いられているタンパク質の定量法は(1) Biuret 法、(2) Lowry 法、(3) Bradford 法、(4) BCA 法、(5) 吸光度法などが挙げられる。本研究では Bradford 法によって全タンパク濃度を決定した。

(1)Biuret 法

Biuret 法は銅()イオンとタンパク質で形成される錯体に基づく定量方法である[4]。この方法はタンパク質のポリペプチド鎖中の窒素原子が、アルカリ性条件下で銅()イオンと結合して赤紫色の錯体を形成して発色する反応を利用したものである。測定する波長は 540 nm である。この方法はタンパク質の組成に依存しないため発色率に大差はないという利点があるが、タンパク質の純度や会合状態に影響を受けるという欠点がある。

(2)Lowry 法

Lowry 法は Biuret 法に Folin phenol 試薬を加えて反応強度を増加させた方法である[5]。この方法はリンモリブデン酸とリンタングステン酸を酸性溶液に溶かした Folin phenol 試薬がアルカリ性でタンパク質中の Tyr や Trp 残基と反応し、青色を呈することを利用したものである。通常 BSA を標準試料として用い、750 nm の吸光度を測定する。感度が最も高いと言われ 5~100 µg/ml の範囲で測定することができる。この方法は還元反応によるものなので、還元物質によって発色が妨害される。またタンパク質によって発色率が異なるという欠点がある。

(3)Bradford 法

本研究で行った Bradford 法とはクマシーブリリアントブルー G-250 (CBB)を用いたタンパク定量法である (Fig. 3-4) [6]。この

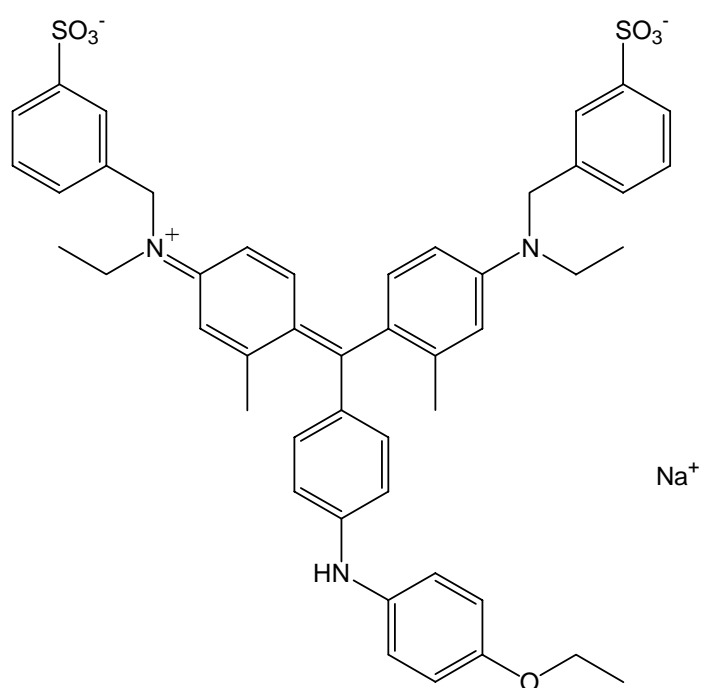


Fig. 3-4. Structure of Coomassie Brilliant Blue G-250.

方法はトリフェニルメタン系の青色色素である CBB が酸性条件下でタンパク質と結合することにより、最大吸収波長が 465 nm から 595 nm へとシフトし、色調が赤紫色から青色へと変化することを利用している。Moreno らはこの反応におけるタンパク質のアミノ基の重要性を証明している[7]。この反応は CBB のスルホン酸基と Lys 残基や Arg 残基間の相互作用が重要である。また、いくつかのグループによって CBB - タンパク質相互作用は Lys 残基や Arg 残基の正電荷による相互作用だけでなく、疎水性相互作用も存在しており、これが重要な役割を果たしていると報告している[8], [9]。

この方法の利点として、妨害物質の影響を受けにくく、迅速に反応を行えるという点が上げられる。CBB とタンパク質との反応は 1 min 以内に終了し、生じた色素は 30 min 以上安定である。

(4)BCA 法

この BCA 法は bicinchoninic acid (BCA)を使った Lowry 法の変法として開発された[10]。アルカリ性条件下でタンパク質が銅(Ⅱ)イオンと反応して銅(Ⅰ)イオンを生じる。この 1 価の銅イオンが 2 分子の BCA と錯体を形成し紫紅色を発する。その紫紅色(波長 562 nm)を測定する事によりタンパク質の濃度を決定することができる。

(5)吸光光度法

この方法はタンパク質中の芳香環の吸収を利用した方法である。タンパク質は Tyr 残基や Trp 残基を含んでおり 280 nm 付近に吸収極大を示す。Tyr 残基や Trp 残基の含量は個々のタンパク質で異なるが、通常 1 mg/ml の濃度の時、吸光度は 1.0 として計算できる。この方法は最も操作が簡単であり、測定後に測定試料の回収も容易である。一方、タンパク質の種類によって吸光度が変化する。280 nm に吸収を持たないタンパク質は測定できないという

欠点がある。

Protein AssayはPierce Biotechnology社（Rockford, IL, USA）のCoomassie Plus-200 Protein Assay Reagentを用いてBradford法で行った。キットに付属のAlbumin Standard (BSA)から濃度100, 250, 500, 750, 1000, 1500 $\mu\text{g/ml}$ の6種を調製した。インターメドジャパン社（Osaka, Japan）のマイクロプレートリーダーImmuno Mini NJ-2300を用いて590 nmの吸光度を測定し、検量線から全タンパク質濃度を算出した。

実験操作

1. 96 穴マイクロプレート中のウェルに Coomassie Plus-200 (150 μl)、測定試料あるいは BSA 溶液(3 μl)加えた。
2. 5~10 分インキュベートした後、マイクロプレートリーダーにセットし 590 nm の吸光度を測定した。
3. 標準として用いた BSA 溶液の吸光度から検量線を作製し、測定試料のタンパク質濃度を算出した。

3-4-3. SDS-PAGE

可溶化させたタンパク質を分離するために SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE とはポリアクリルアミドゲルの分子ふるい作用によって、タンパク質の分子量に基づいて分離する方法である。タンパク質は還元条件下で SDS によって変性し、SDS と複合体を形成する。形成された SDS 複合体は、周囲に存在する過剰のドデシル硫酸イオンによって、固有の電荷にかかわらず負に荷電し、一定の電場中を一定の速度で移動する。従って、BIS によって架橋されたポリアクリルアミドゲル中を移動するときに、ゲルの分子ふるい作用によりタンパク質は分子量に基づき分離される。

電気泳動は Amersham Biosciences 社の SE 260 Mini-Vertical Gel Electrophoresis Units を用いて行い、岩城硝子(株)社(Tokyo, Japan)の Power Supply EPM-7612D を用いて電場をかけた。Acrylamide solution は SERVA Electrophoresis 社(Heidelberg, Germany)の Acrylamide-BIS solution (37.5: 1), 30% (w/v)を用いた。標準分子量マーカーは BIO-RAD Laboratory 社の Kaleidoscope Prestained Standard と New England Biolabs 社(Frankfurt, Germany)の Prestained Protein Maker, Broad Range (6-175 kDa)を用いた。

実験操作

1. 可溶化させたタンパク質溶液を 2X Sample treatment buffer (125 mM TrisCl, 4% SDS, 20% glycerol, 2% 2-mercaptoethanol, 0.002% BPB)と 1:1 の比率で混合させた。
2. 操作 1 の溶液をホットドライバス (HDB-1) を用い 100°C で約 3 分間処理した。
3. 電気泳動装置を組み上げ、分離ゲル (10% T, 2.6% C)、濃縮ゲル (4% T, 2.6% C) を調製した。(分離ゲル: Acrylamide solution (10.0 ml), 1.5M TrisCl pH8.8 (7.5 ml), 10% SDS (300 μ l), 10% APS (150 μ l), TEMED (10 μ l), H₂O (Total 30 ml に調整); 濃縮ゲル

ル : Acrylamide Stock (2.7 ml), 0.5M TrisCl pH6.8 (5.0 ml), 10% SDS (200 μ l), 10% APS (100 μ l), TEMED (10 μ l), H₂O (Total 20 ml に調整))

4. ゲルの各レーンには全タンパク量が 30 μ g になるように計算し、測定試料をチャージした (約 30 μ l)。
5. Running buffer (25 mM TrisCl, 192 mM Gly, 0.1% SDS, pH8.3)、定電圧 150 V で電気泳動を行い、好中球に存在していたタンパク質を分離した。

3-4-4. Western Blotting

ウェスタンブロットとは SDS-PAGE でゲル内に展開されたタンパク質をメンブランフィルターに転写した後、目的タンパク質を検出する方法である。ゲルの陽極側にメンブランフィルターを重ね、ゲルと垂直の方向に電場をかけることで、タンパク質を電気泳動的にメンブランへ転写できる。このメンブランフィルターにはニトロセルロースや PVDF などが用いられる。この両者を比較すると PVDFの方がタンパク質に対し高い吸着能力を示す。メンブランフィルターに吸着した目的タンパク質を検出するため、標的タンパク質に結合する一次抗体、酵素標識された二次抗体、可視化のための基質が用いられる。標識酵素にはペルオキシダーゼや、アルカリホスファターゼなどが用いられる。検出方法には化学発光や発色による方法などがある。このウェスタンブロット法はタンパク質の検出方法としてはかなり高感度であり、ピコグラムオーダーのタンパク質を検出することができる。

本研究での検出原理は、光架橋により形成された FPR-fMLP アナログ中の酵素標識タグであるビオチン残基に、ペルオキシダーゼ標識したアビジンを作用させ、これにルミノール試薬を加えると、ペルオキシダーゼの働きによって生じた O_2^{2-} と反応し、蛍光が発せられる (Fig. 3-5)。この蛍光を検出することによって標的の FPR を同定した。

タンパク質を転写した PVDF 膜は MILLIPORE 社のイモビロン - P^{SQ} トランスファーメンブレンを用いた。一次抗体は Sigma 社の STREPTAVIDIN-PEROXYDASE labeled (streptavidin-HRP)を用いた。検出試薬は Pirece Biotechnology 社の SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate Trial Kit を使い、Alpha Innotech Corporation 社 (San Leandro, CA, USA) の ChemImager 4000 上で蛍光を検出した。

実験操作

1. SDS-PAGE のゲルと PVDF 膜をサンドイッチにして、ブロッティング装置にセットした。
2. 定電圧 45 V で 2 時間冷却しながら PVDF 膜に転写した。
3. Blocking buffer 50 ml に浸し、2 時間 ~ 一晩振盪した。
4. TBS-T (10 mM TrisCl, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20) 50 ml で 3 回洗浄した (各 10 分)
5. Streptavidin-HRP を TBS-T 50 ml に加えた溶液中で 1 時間振盪した。
6. TBS-T 50 ml で 3 回洗浄した (各 10 分)
7. Kit に付属している試薬を振りかけた後、5 分間インキュベートした。
8. PVDF 膜を検出装置にセットし、CCD カメラによって蛍光をとらえた。

[Bpa⁴, Ahx₂]-fMLP と fMLP の競合実験の結果を Fig. 3-6 に、[Bpa², Ahx₂]-fMLP と fMLP の競合実験の結果を Fig. 3-7 に示す。Ahx スペーサーの短い[Bpa⁴, Ahx₀]-fMLP、[Bpa⁴, Ahx₁]-fMLP では全く目的の光架橋された FPR のバンドが検出できなかった。これは推定されている FPR の第 5 膜貫通部分の結合部位のところに Arg, Arg の密集部分があり、第 2 膜貫通部分の直前に Arg, Lys の密集部分がある[]。これらのアナログが結合部位に入り込む際、受容体側のこの Arg, Arg や Arg, Lys の密集部分とアナログ側の -Arg-Arg-Lys-配列が電氣的に反発しあい結合部位に入り込むことができず、光架橋反応が進行しなかったためではないかと考えられる。この結果は、生理活性の結果ともよく一致している。

一方、二つの Ahx スペーサーを持つ [Bpa⁴, Ahx₂]-fMLP、[Bpa², Ahx₂]-fMLP では 40kDa 付近に光架橋された FPR と思われるバンドが観測できた。FPR の分子量は 38kDa であり、fMLP アナログの分子量は 1.6kDa であるので、光架橋された複合体の分子量は約 40kDa にな

る。このバンドは光架橋の際に共存させた fMLP の濃度が減少するに従い、より顕著に現れた。これらのことから fMLP によって阻害されるこのバンドは光架橋された FPR-fMLP アナログ複合体のバンドであると考えられた。この結果は、生理活性の結果とよく一致するものであり、今回デザインした fMLP アナログが FPR に作用して生理活性を示していることが確認された。

今回、光アフィニティーラベルとして用いた Bpa 残基は側鎖に化学的に安定で、周囲に光が存在しても比較的容易に扱うことができるベンゾフェノン photophore を有している。この特徴は Bpa 残基をリガンドペプチド中に導入するのに有利であり、また、タンパク質へのダメージを抑制することに対しても有利である。

第2の標識として用いたビオチン残基はアビジンと強く相互作用するため生化学の研究で広く用いられている。このビオチン-アビジンシステムと、Bpa 残基などを用いた光架橋実験と組み合わせることは、薬物 - 標的受容体の相互作用様式を解明するための有用なツールとなることが示された。

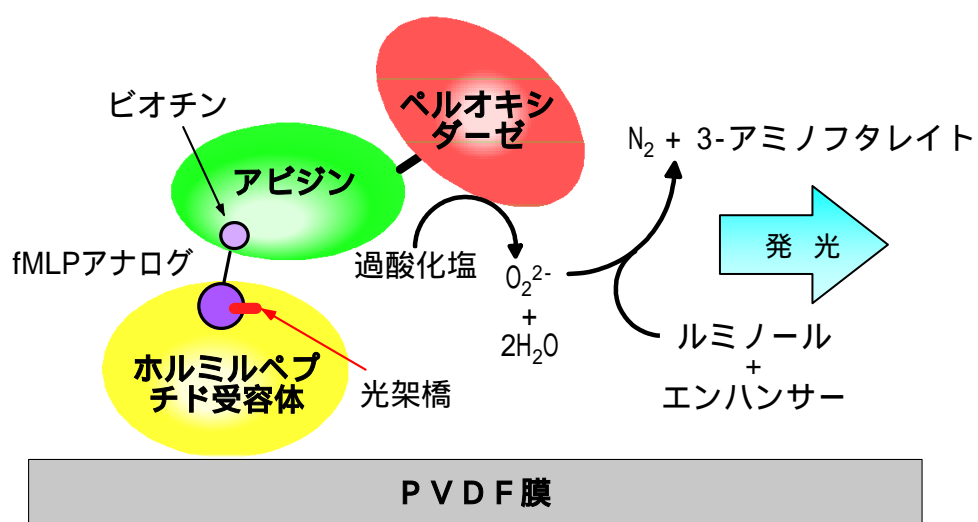


Fig. 3-5. Western blotting of FPRs.

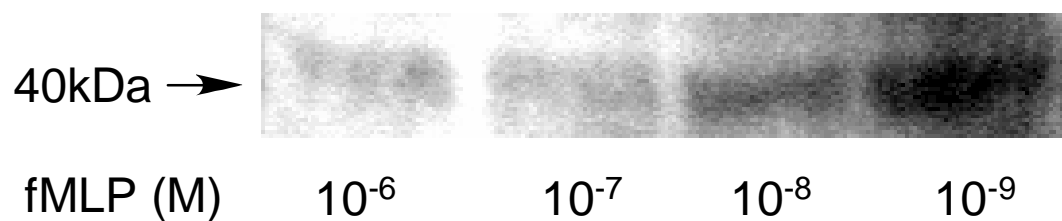


Fig. 3-6. Cross-linking of [Bpa⁴, Ahx₂]-fMLP.
Cross-link time: 10 min.; Peptide concentration: 10^{-6} M

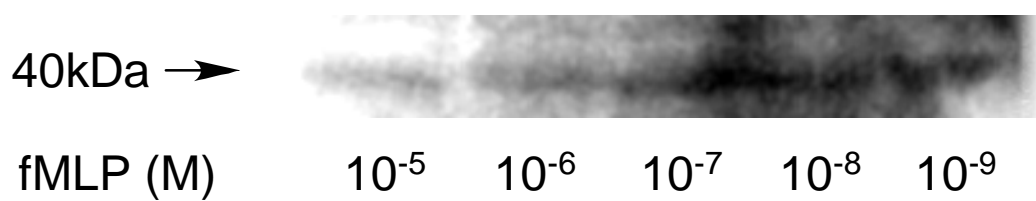


Fig. 3-7. Cross-linking of [Bpa², Ahx₂]-fMLP.
Cross-link time: 10 min.; Peptide concentration: 10^{-6} M

3-5. 参考文献

- [1] Falk, W., Goodwin, R.H. Jr. and Leonard, E.J. (1980) *J. Immunol. Methods*, **33**, 239-247.
- [2] Fujita, I., Irita, K., Takesgige, K. and Minakami, S. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **120**, 318-324.
- [3] Fabbri, E., Spisani, S., Biondi, C., Barbin, L., Colamussi, M.L., Cariani, A., Traniello, S., Torrini, I. and Ferretti, M. E. (1997) *Biochem. Biophys. Acta*. **1359**, 233-240.
- [4] Gornall, A. G., Bardawill, C.J. and David, M. M. (1949) *J. Biol. Chem.* **177**, 751-766.
- [5] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- [6] Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- [7] Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermansen, G.T., Malia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85.
- [8] de Moreno, M.R., Smith, J.F. and Smith, R.V. (1986) *J. Pharm. Sci.*, **75**, 907-911.
- [9] Tal, M., Silberstein, A. and Nasser, E. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 9976-9980.
- [10] Fountoulakis, M., Juranville, J.F. and Manneberg, M. (1992) *J. Biochem. Biophys. Methods*, **24**, 265-274.
- [11] Mills, J.S., Miettinen, H.M., Barnidge, D., Vlases, M.J., Wimer-Mackin, S., Dratz, E.A., Sunner, J. and Jesaitis, A.J. (1997) *J. Biol. Chem.*, **273**, 10428-10435.

第 4 章

Microreactor

マイクロリアクター

新規な薬剤を開発する上で重要なことは、薬剤と標的タンパク質がどのように結合し、どのような機能を有するかを明らかにすること、効率的な評価システムが存在するかの2点だと考えられる。前者のタンパク質の解析方法については、2, 3章で述べてきた。後者の評価システムについてはこの章および5章で述べていく。

まずこの章では、本研究で用いたマイクロリアクターについて述べていく。

4-1. マイクロチップ技術

現在、新規な薬剤を開発するためにコンビナトリアル合成により多くの薬剤候補化合物が合成されている。これらの化合物は莫大な量に上り、各化合物を一つ一つ評価していたら莫大な時間・労力・費用がかかるため、ごく少量かつ大量処理が可能なハイスループットスクリーニング（HTS）技術の確立が必要不可欠である。

この HTS に対しマイクロチップ技術の適用は、マイクロチップ技術の有する利点が製薬工業に求められている必要性によく一致する研究領域である。ゲノム創薬の発展にともなう多くの薬剤候補化合物のライブラリーから薬剤をスクリーニングすることにおいて研究、開発コストを減少させることが、新薬を開発する製薬企業に求められている。技術開発の多くは分析評価の自動化と微小化に焦点が当てられて行われてきた。スクリーニングの微小化は試薬の消費量を減少させ、パラレルなサンプル処理と多重検出を行うことによって、よりハイスループットな分析評価を容易にする。現在、多くの HTS はロボットによるハンドリングと分離が行われる 96 ウェルマイクロプレート中で行われている。このスクリーニング用ロボットとして浜松ホトニクス（株）社（Hamamatsu, Japan）の FDSS シリーズなどが挙げられる。更に、このマイクロプレートフォーマットはより高いウェル密度と微小体積を持つ 384 ウェル、1536 ウェル、3456 ウェ

ルといった方向に発展している (Table 4-1) [1-5]。

生化学や薬理学に応用するマイクロチップ技術は二つの微小化へのアプローチを提供する。一つは DNA チップなどに代表されるマイクロアレイ技術である。これらは固相担体上にペプチドやタンパク質、あるいはオリゴヌクレオチドなどを結合させ、生化学物質どうし、あるいは他の薬物などとの相互作用を利用して、特定の物質の検出を可能とするものである。もう一つはマイクロ流体素子 (Microfluidic device) と呼ばれるもので、チップ上に微細な流路を形成させ、ここに気体や液体などの流体を流して、それらの流れを利用して、化学的あるいは生化学的な反応を行うものである。薬剤スクリーニングに用いられるマイクロ流体素子として Aclara Biosciences 社 (Mountain View, CA, USA) の CellChipTM[6]、Caliper Technology 社 (Mountain View, CA, USA) の LabChipTM が挙げられる (Fig. 4-1) [7-9]。これらのマイクロ流体素子はサブマイクロリットルの溶液を用いても、蒸発による誤差を生じにくいためスクリーニングチップの微小化に有利だと考えられる。しかし、これらの市販のマイクロ流体素子の測定には専用の測定装置が用いられているため、その高価な専用の測定装置を購入が必要となるという欠点も有する。そこで本研究では、マイクロリアクターと呼ばれるマイクロチップを用い、専用の測定器を用いずとも低価格で簡便に薬剤のスクリーニングが行えるシステムの開発を試みた。

Table 4-1. Comparison of the volume between conventional 96-well microplate and higher density microplate.

Well	96	384	1536
Total Volume (μ l)	>300	115	13
Working Volume (μ l)	>50	10 ~ 100	2 ~ 10

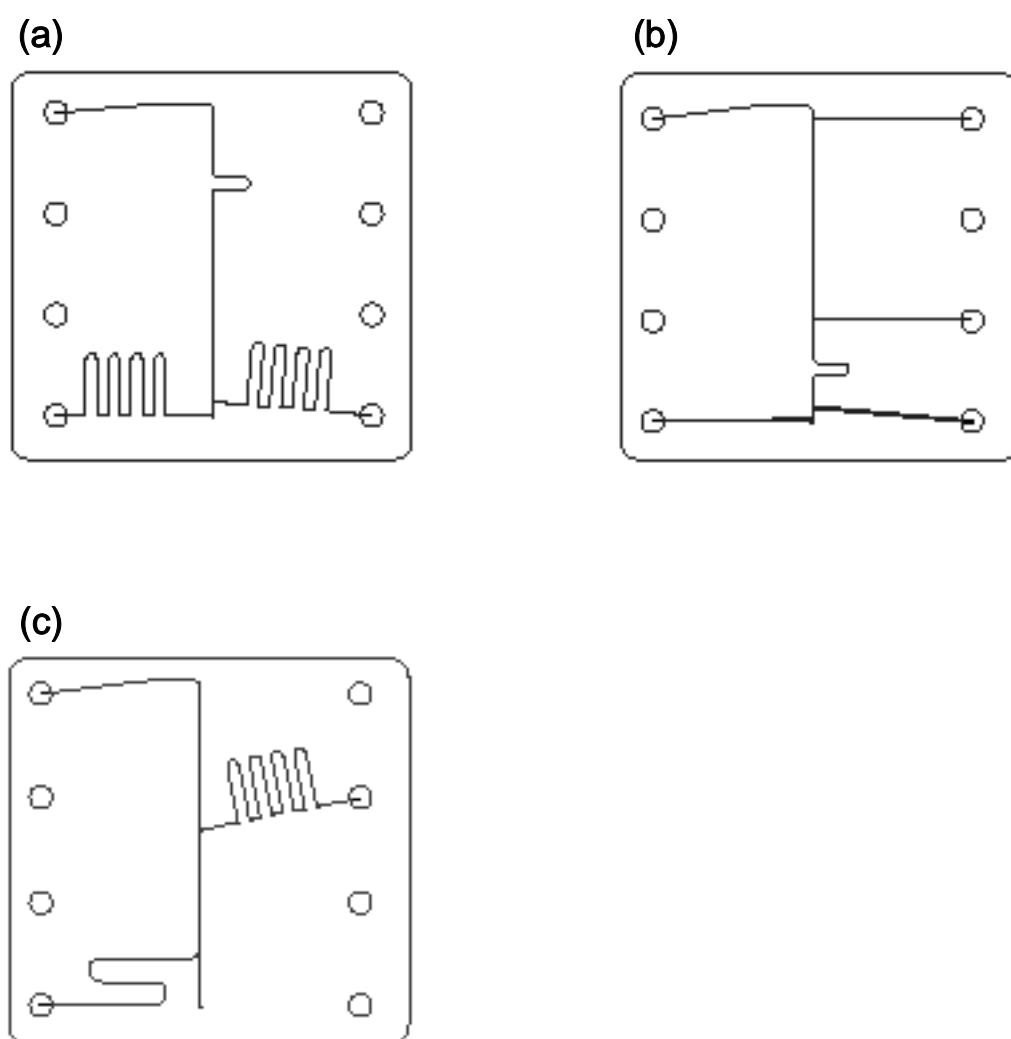


Fig. 4-1. LabChip™ designs for continuous flow (a) fluorogenic enzyme assays, (b) separation-based kinase assays, and (c) cell-based assay.

4-2. マイクロリアクター

4-2-1. マイクロリアクターとは

近年、半導体などに用いられる微細機械加工技術を利用して種々の基盤上に微細な構造を形成させるマイクロリアクター技術が世界中の注目を集め、研究がなされている[10-18]。‘マイクロリアクター’という語は、実際にはマイクロ技術がマイクロ流体目的に応用されるよりもずっと前から使用されてきた。典型的なものとして、従来の機械工学で製作されるセンチメートル単位の小さなリアクターがマイクロリアクターと呼ばれ、マクロなリアクターと同様なプロセス条件下での反応を調べるために使用されていた。‘マイクロリアクター’の定義はまだ確立されていないが、D. Hönicken は固体基盤上にマイクロテクノロジーの適切なプロセスによって形成される化学反応用の3次元構造体で、通常 $500\mu\text{m}$ より小さな直径の流路（マイクロチャンネル）の中で反応を行うマイクロチャンネルリアクターと呼ぶべきものだとして定義している。また、広義には μ -TAS (Micro Total Analysis System)や‘Lab-on-a-chip’と呼ばれるものも、このマイクロリアクターに含まれる。

4-2-2. マイクロリアクターの特徴

マイクロリアクターを用いる反応では、マクロな実験器具を用いる反応には見られない、いくつかのマイクロ空間に特有の特徴を示す。この特徴は以下の(1)～(4)のようにまとめられる。

(1) 単位面積あたりの比表面積が大きい

マイクロリアクターの流路では、流路幅が狭いため単位体積あたりの比表面積が格段に大きくなる。そのため気液反応のような不均一反応を効率よく行える。また、リアクター壁面に触媒や各種の化合物を担持して起こす反応にも有用であると考え

られる[20]。

(2) 流体の流れが層流となる

一般のゴムホースのような大きな流路内では流体は乱流(turbulent flow)を起こしているが、マイクロリアクターなどの流路内では層流(laminar flow)となる(Fig. 4-2)。このような流体の状態を判断する指標としてレイノルズ数(Re)が用いられる。このレイノルズ数は以下の等式 4.1 から導かれる。

$$Re = \frac{\rho v d}{\mu} \quad (4.1)$$

ρ は流体の密度[kg/m³]、 v は流体の平均速度[m/sec]、 d は流路の内径[m]、 μ は流体の粘度[Pa/sec]である。従って、レイノルズ数は無次元数となる。このレイノルズ数が 2300 以下になると流体は層流となると考えられている。このような層流の条件では層分離などが簡単になり、その特徴を有した二層系の反応や生成物の分離精製が可能となると期待される。

(3) 効率のよい温度制御が可能

マイクロリアクターでは装置全体が小さいため、熱交換の効率が極めて高い。従って、従来のフラスコ内では発熱によって暴走する危険のある反応でも、よく制御して行えるようになる[21]。この特徴は精密な温度制御を必要とする反応や、急激な加熱や冷却を必要とする反応でも容易に行える可能性を示唆している。また、精密な温度制御により副反応を抑えることができ、目的化合物の収率向上を計ることができる。

(4) 用いる試薬の減少

マイクロリアクターでは格段にサイズを小さくできるため、

用いる試薬の量やコストを抑えることができる。また、用いる試薬が少ないため、結果として廃液量も少なくなり、環境への負荷を低減させることができる。

このほかにもマイクロリアクターを用いた時の利点として以下の事柄が挙げられる。

- ・ マイクロ流路を有するため、物質の拡散長が短く、反応の高速化が期待される。
- ・ 化合物の前処理、反応、精製などの一連の多段階の反応を一つのチップ上に集約することができる。
- ・ 小型のチップのため省スペースで研究を行うことができる。
- ・ 複数枚のチップを集積、積層化することでパラレルな反応が可能となる。また、反応のスケールアップも容易に行える。

以上に述べてきたようにマイクロリアクターには数多くの特徴がある。多くの化合物ライブラリーから、微量かつ多量の薬剤候補化合物を迅速に薬理評価することが求められる薬剤スクリーニングに、このマイクロリアクターを応用するのは非常に有利だと考えられる。

4-2-3. マイクロリアクターの作製方法

マイクロリアクターのキーとなる部分は、マイクロチャネルの微細な構造体である。そのマイクロチャネルは微細加工による流路の作製、別の基盤と接合させるという行程を経て形成される。

微細加工技術は機械的、物理的、化学的方法に大別される。機械的方法としては、従来から存在する機械加工装置を用いるほかに、超音波加工などがある。近年では、マイクロマシニング用の装置も売り出されており、それらを利用することができる。この機械加工法では工具の消耗、加工後のバリ、脆性材料を基盤に用いた際に

起きるチIPPINGといった問題が存在する。

物理的な方法としては放電加工やレーザー加工などが挙げられる。放電加工では μm オーダーの加工が可能ではあるが、電極ツールの製作コストおよび消耗が大きな課題であり、 μm オーダーの加工を量産化させるのは難しい。レーザー加工にはエキシマレーザーが用いられる。この方法はレーザーのエネルギーを上げることで、金属やガラスの加工にも利用できるが、ポリカーボネートやポリイミドなどのプラスチックの加工にも適している。ガラス、金属の加工には193 nm の ArF、プラスチックの加工には 248 nm の KrF を用いることが多い。このレーザー加工においては深さ方向の制御に課題が残っている。

化学的な加工方法はウェットエッチングとドライエッチングの二つに大別される。ドライエッチングの例として DRIE (Deep Reactive Ion Etching) 技術が挙げられる。この方法は ICP (Inductively Coupled Plasma) という手法で励起されたプラズマによってシリコンをエッチングする方法であり、微細なマイクロチャネルの加工に適している。エッチングサイクルとパッシベーション (保護) サイクルを繰り返すことによって、アスペクト比の高いエッチングが可能となる。ドライエッチングという手法はシリコン以外の材料やガラスなどにも適用可能であるが、アスペクト比などが劣るといった欠点がある。以上に述べてきたように金属、シリコン、ガラス、プラスチックなど様々な材料に対し、種々の技術が微細加工に利用できる。

接合方法は間接的な方法と直接的な方法に分かれる。間接的な方法の代表として接着剤による方法が挙げられる。この間接的な方法では、微細なマイクロチャネルが接着剤などによって閉塞してしまうといった欠点が存在する。直接的な方法として加熱処理することによる熔融接合、シリコンとガラスの接合に用いられる電圧の印可による大きな静電引力を利用した陽極接合など様々な技術がある。このような技術を用いることにより、金属、シリコン、ガラス、プ

ラスチックなど様々な材料において、同種、異種の組み合わせで接合することが可能となる。

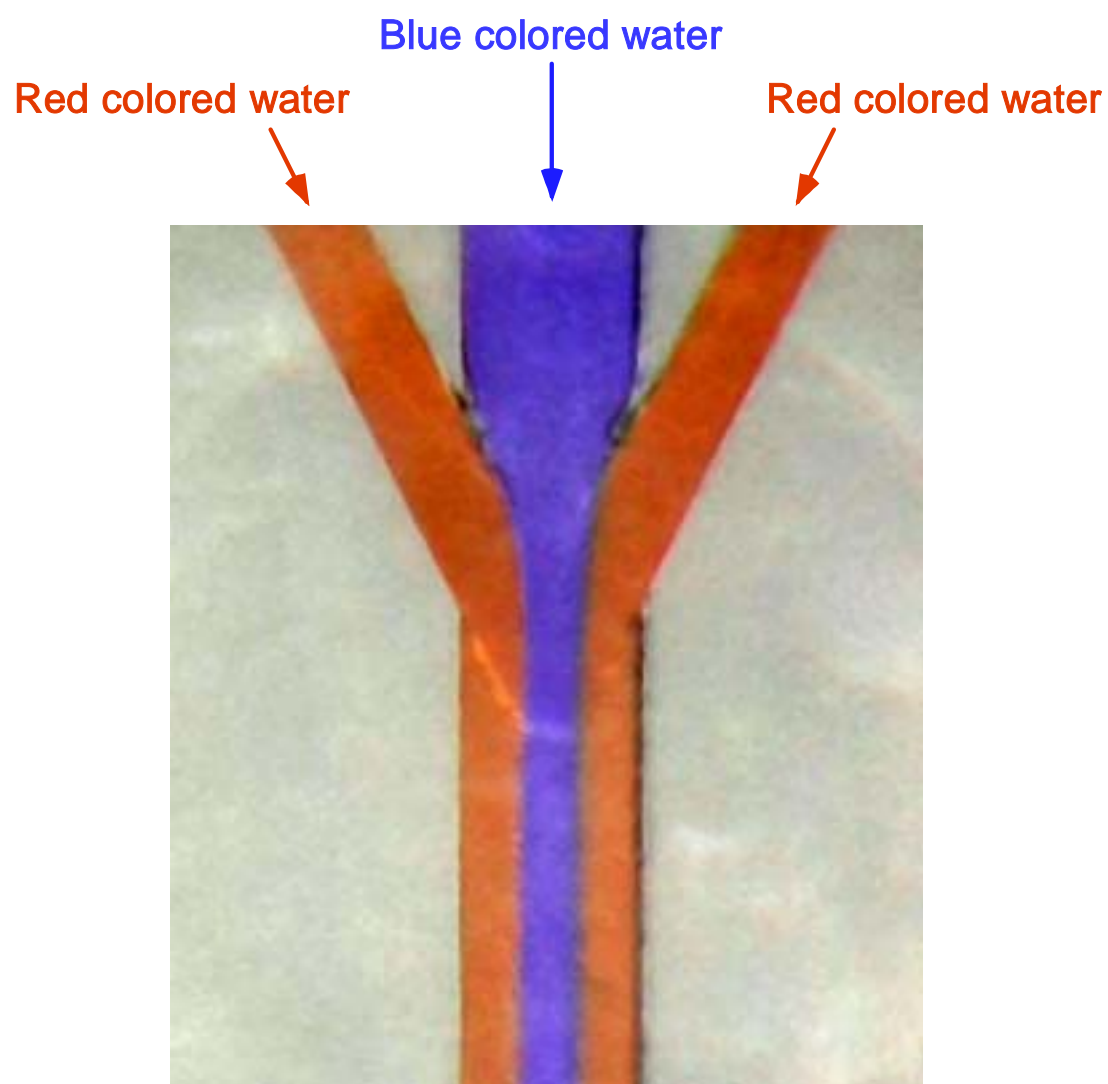


Fig. 4-2. Laminar flow in microreactor.

4-3. マイクロリアクターの作製と評価

マイクロリアクターの作製に当たり、まず始めに素材の選定が必要となる。マイクロリアクターの素材としては金属、シリコン、ガラス、プラスチック、セラミックスなどが利用可能である。研究初期の機械的要素を含むマイクロ化学分析システムは、シリコンとガラスの積層構造を用いたものが主流であった。これはシリコンが集積回路用素材であり、微細加工技術の蓄積があったためである。シリコン基盤上には化学センサーや集積回路が一体化できるため、高機能システムが実現できる可能性を秘めている。また、マイクロセンサーの作製にシリコン - ガラスの多層構造が広く用いられていたため、接合技術が確立されており、チャンネルの形成が容易に行えるというメリットもあった。近年では、コスト削減のため加工や成形が容易なプラスチックや樹脂を用いる場合が多い。また、生体高分子との相性や製造プロセスの簡便性などの理由から PDMS (polydimethylsiloxane) が用いられることもある [21]。

本研究において、リアクターの基盤は透明度の高く、また強度、剛性が高いためドリルによる切削が可能であるアクリル樹脂 (PMMA) を選択した。微細加工法として、マイクロドリルを用いた微細機械加工技術を採用した。機械加工法は 100 μm 以上の流路であれば比較的短時間に低コストで加工できるという利点を持つ。工作機械は、ファナック (株) 社 (Yamanashi, Japan) の NC 工作機械 (α -T14As) を用い (Fig. 4-3)、湿式法で流路を切削・加工した。マイクロドリルはドリル先端が平坦になっている日立ツール (株) 社 (Tokyo, Japan) の小径ソリッドエンドミル (ϕ 100, 200, 400, 700 μm) を用いた (Fig. 4-3)。流路の寸法、形状の判断はキーエンス (株) 社 (Osaka, Japan) の超深度レーザー顕微鏡 (Microscope VK-8500) を用いて行った。マイクロリアクターの形成手順を以下に示す。

形成手順

1. マイクロチャネル形状をデザインした。
2. デザインを XYZ の 3 軸座標系へ変換した。
3. ドリル回転数、ドリル送り速度等の加工条件の決定。
4. 上記の 2 , 3 から工作機にインプットする G コードプログラムを作成した。
5. 工作機に上記プログラムをインプットし、コンピューター制御による自動加工で流路を切削した。
6. 加工後の基盤を洗浄し、超深度顕微鏡で流路の形状・寸法を診断した。
7. 未加工の亚克力板と重ね合わせ、0.8 N・m の荷重をかけ、PMMA のガラス転移温度である 120°C で 4 時間圧着した。

本研究には 3 種類のマイクロリアクターを用いた。それぞれのマイクロリアクターはデザイン・作製した順に Flow 1 chip、Flow 2 chip、Flow 3 chip と呼ぶことにした。デザイン・作製したマイクロリアクターの模式図、写真を Fig. 4-4 ~ 4-6. に示す。

Flow 1 chip は縦 30 mm、横 30 mm、厚さ 2 mm の亚克力板に流路幅 400 μm 、流路深さ 200 μm のマイクロチャネルを形成させた。超深度顕微鏡測定の結果、加工した流路は誤差 $\pm 3 \%$ 以内の寸法精度を誇っていた。

Flow 2 chip は縦 30 mm、横 30 mm、厚さ 2 mm の亚克力板に流路幅 200 μm 、流路深さ 200 μm のマイクロチャネルを形成させた。超深度顕微鏡測定の結果、加工した流路は誤差 $\pm 5 \%$ 以内の寸法精度を誇っていた。

Flow 3 chip は縦 30 mm、横 30 mm、厚さ 2 mm の亚克力板に流路幅 200 μm 、流路深さ 100 μm のマイクロチャネルを形成させた。超深度顕微鏡測定の結果、加工した流路は誤差 $\pm 7 \%$ 以内の寸法精度を誇っていた。

これらの3種類のマイクロリアクターを用いて行ったFPRの活性化および活性化の阻害実験については第5章で述べる。

(A)



(B)



(C)

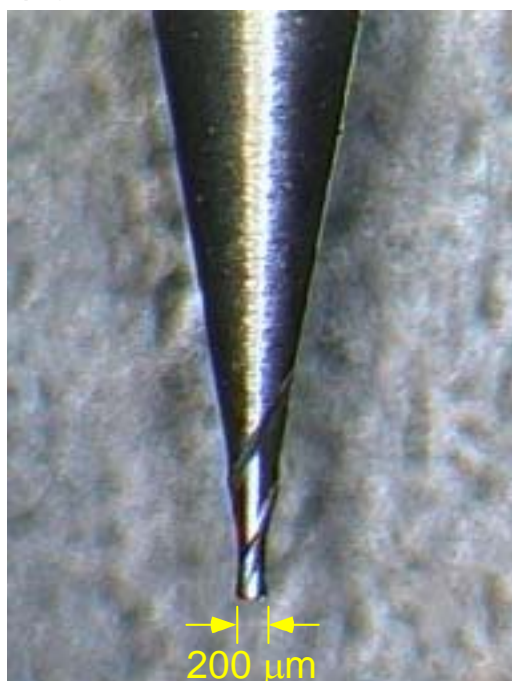
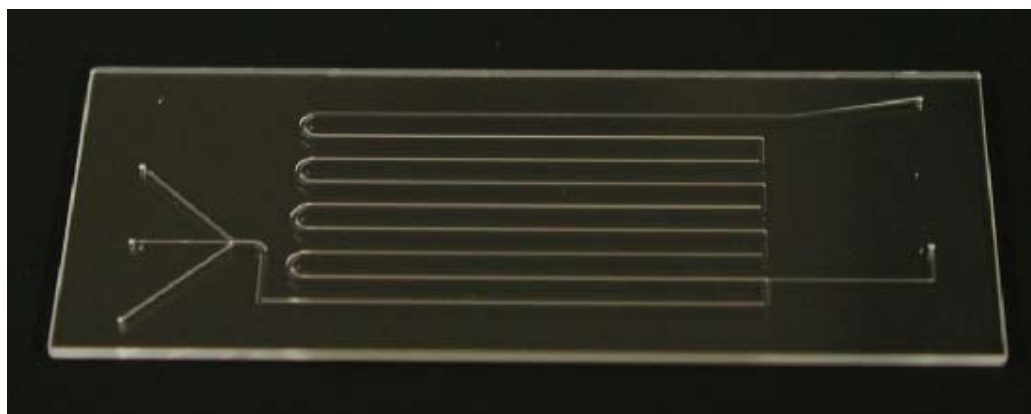


Fig. 4-3. Microfabrication apparatus for microchannel reactor. (A) NC machine tool, (B) cutting scene, (C) flat-end mill (ϕ 200 μ m).

(A)



(B)

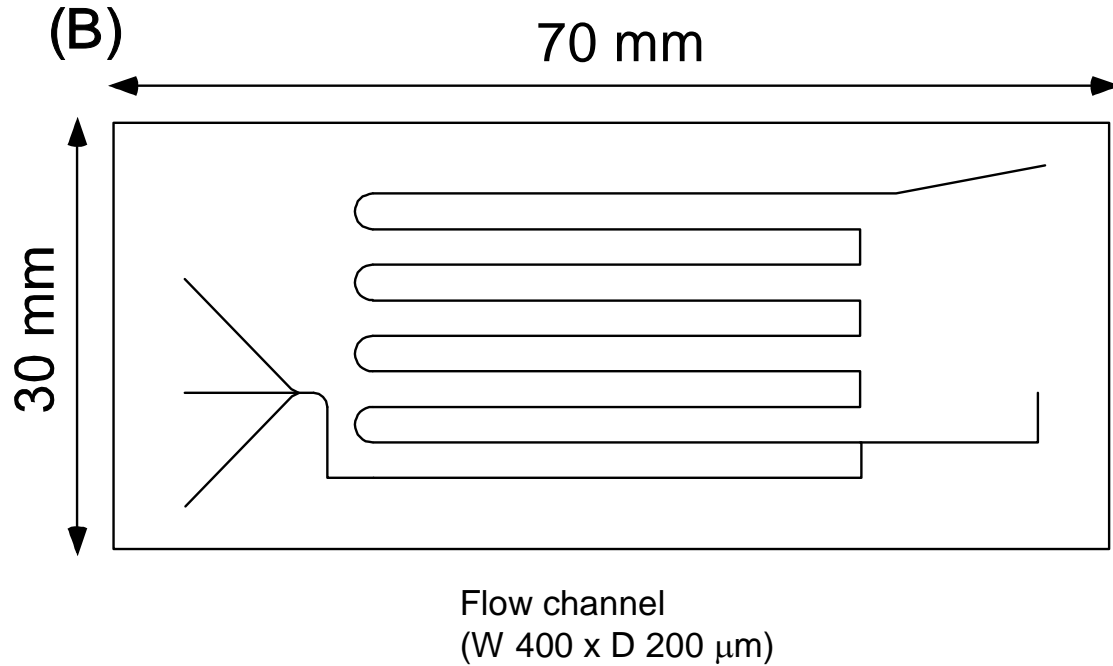


Fig. 4-4. Microchannel reactor named Flow 1 chip. (A) Photograph, (B) Pattern diagram.

(A)



(B)

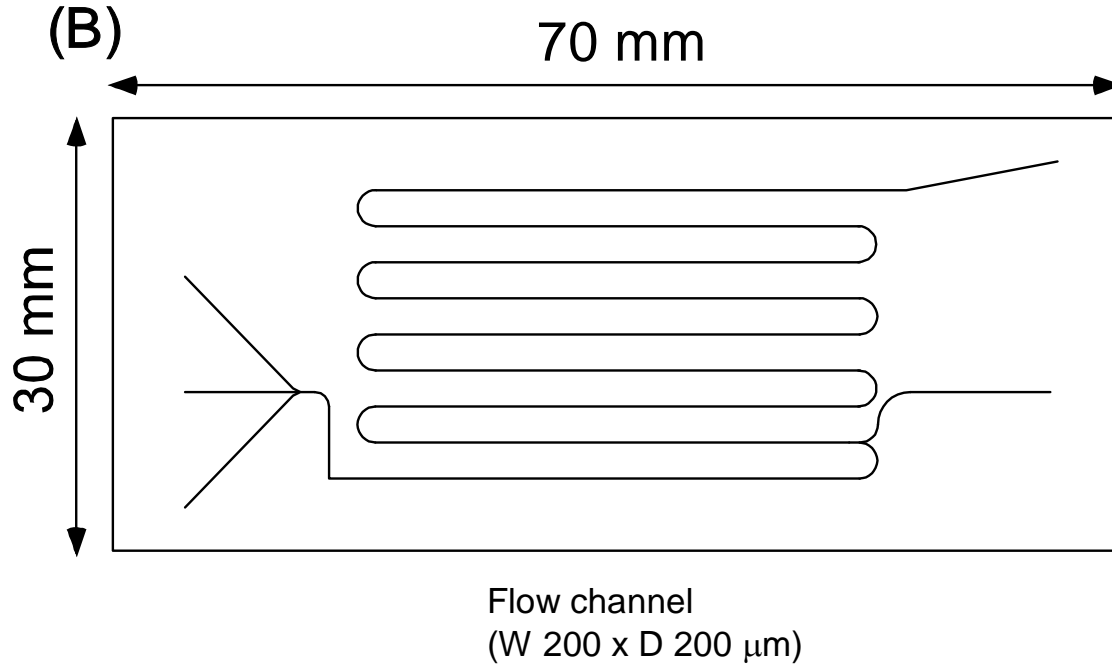


Fig. 4-5. Microchannel reactor named Flow 2 chip. (A) Photograph, (B) Pattern diagram.

(A)



(B)

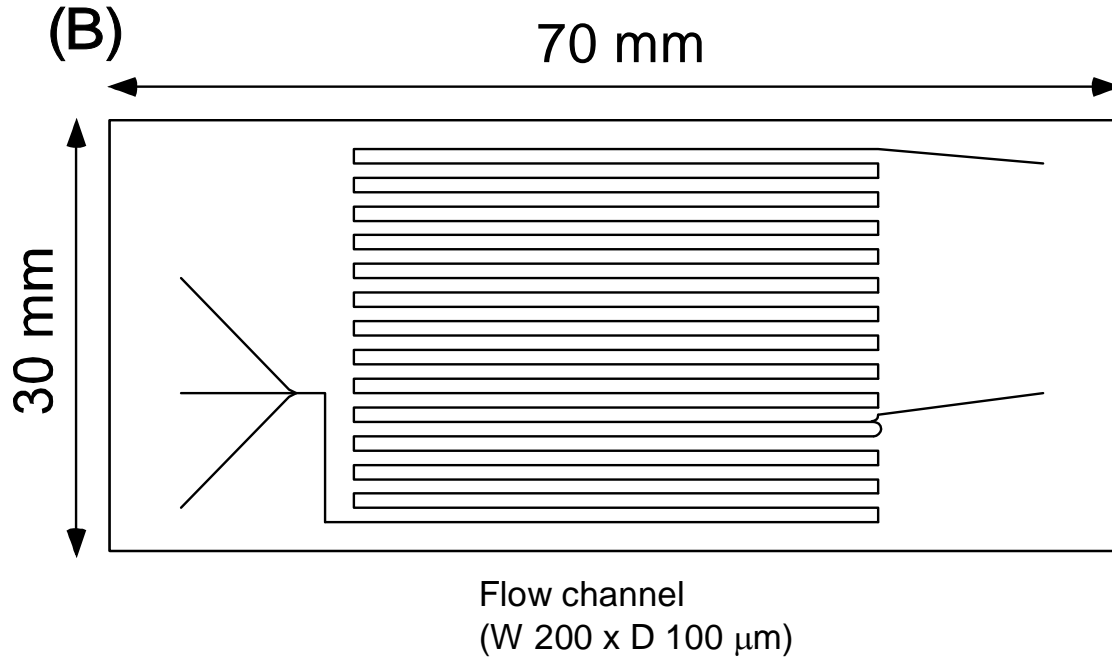


Fig. 4-6. Microchannel reactor named Flow 3 chip. (A) Photograph, (B) Pattern diagram.

4-4. 参考文献

- [1] Ullman, D., Busch, M. and Mander, T. (1999) *J. Pharm. Technol.*, **99**, 30-40.
- [2] Mere, L., Bennett, T., Coassin, P., England, P., Hamman, B., Rink, T., Zimmerman, S. and Negulescu, P. (1999) *Drug Discov. Today*, **4**, 363-369.
- [3] Dunn, D.A. and Feygin, I. (2000) *Drug Discov. Today*, **5** (Suppl. *High-throughput screening*), S84-S91.
- [4] Burbaum, J.J. (1998) *Drug Discov. Today*, **3**, 313-322.
- [5] Herzberg, R.P. and Pope, A.J. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**, 445-451.
- [6] ACLARA Bioscience homepage on World Wide Web URL: <http://www.aclara.com/>
- [7] Caliper homepage on World Wide Web URL: <http://www.caliper.com/>
- [8] Sundberg, S.A., Ghow, A., Nikiforov, T. and Wada, H.G. (2000) *Drug Discov. Today*, **5** (Suppl. *High-throughput screening*), S92-S103.
- [9] Sundberg, S.A. (2000) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 47-53.
- [10] Miyazaki, M., Nakamura, H. and Maeda, H. (2001) *Chemistry Letters*, **5**, 442-443.
- [11] Ogino, K., Miyazaki, M., Nakamura, H. and Maeda, H. (2002) *ITE Lett.*, **3**, 362-366.
- [12] Tamaki, E., Sato, K., Tokeshi, M., Sato, K., Aihara, M. and Kitamori, (2002) *Anal. Chem.*, **74**, 1560-1564.
- [13] Hisamoto, H., Horiuchi, T., Uchiyama, K., Tokeshi, M., Hibara, A. and Kitamori, T. (2001) *Anal. Chem.*, **73**, 5551-5556.
- [14] Yang, H. and Chien, R.-L. (2001) *J. Chromatogr. A.*, **924**, 155-163.
- [15] Kenis, P.J.A., Ismagilov, R.F. and Whitesides, G.M. (1999) *Science*, **285**, 83-85.
- [16] Ferrigno, R., Stroock, A.D., Clark, T.D., Mayer, M. and Whitesides,

- G.M. (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12930-12931.
- [17] DeWitt, S.H. (1999) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 350-356.
- [18] Graß, B., Neyer, A., Jönck, M., Siepe, D., Eisenbeiß, F., Weber, G. and Hergenröder, R. (2001) *Sens. Actuator B-Chem.*, **72**, 249-258.
- [19] Perterson, D.S., Rohr, T., Svec, F. and Fréchet, J.M.J. (2002) *Anal. Chem.*, **74**, 4081-4088.
- [20] Chambers, R.D. and Spink, R.C.H. *Chem. Commun.*, **1999**, 883-884.
- [21] 藤井輝男 (2001) *ながれ*, **20**, 99-105.

第5章

Activation of Formyl-peptide Receptors Using Microreactor

マイクロリアクターを用いた 受容体の活性化

この第5章では、4章で作製したマイクロリアクターを用いて、ホルミルペプチド受容体の活性化について検討を行った。

5-1. リアクター反応のデザイン

5-1-1. FPR の活性化

fMLP などのホルミルペプチドによる FPR の活性化によって、様々な好中球の応答が引き起こされることは、第1章で述べてきた。この様々な生理活性の中でマイクロリアクターに応用し得るものを検討したところ、FPR シグナルによる細胞内カルシウム濃度の増加をリアクター反応に応用することが、他の受容体活性化研究にも応用でき、有用であると考えた。そのため、本研究では通常の蛍光光度計で測定を行う蛍光検出をマイクロリアクターに応用した (Fig. 5-1)。マイクロリアクター中にカルシウム蛍光プローブを取り込ませた好中球懸濁液を流通させ、fMLP 刺激による細胞内カルシウム濃度の増加を、カルシウム蛍光プローブを用いて蛍光強度変化を測定した。

5-1-2. カルシウム蛍光プローブの選択

近年、様々な要求に応えるため多様なカルシウム蛍光プローブが開発され、細胞内カルシウムの測定に用いられている [1-6]。その種類も数も多く、現在では測定する目標や用いる装置の特性に併せて様々な選択ができる (Fig. 5-2, Table 5-1)。カルシウム蛍光プローブの基本骨格は *O,O'*-bis(2-aminophenyl)ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (BAPTA) であり、 Ca^{2+} 選択的な錯形成挙動を示す。この BAPTA は *O,O'*-bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) と同様の Ca^{2+} 選択的キレート剤であり EGTA と比較し、 Ca^{2+} 親和性の pH 依存性が低く中性以上でほぼ一定で、錯形成・解離が速く、 Ca^{2+} 錯体の解離定数が生理的な細胞中の Ca^{2+} 濃度に近いといった特徴を有する。蛍光性基としてはベンゾフラン、

インドール、キサンテン骨格などが利用されており、その蛍光性基によって蛍光プローブの蛍光特性が決まる。

蛍光プローブは細胞内に導入しなければならないが、水溶性のためそのままでは細胞膜を通過できない。そこで細胞膜の透過性が高くなるように修飾した誘導体を用いる場合が多い。この細胞膜の透過性を高めた蛍光プローブとしてよく用いられるのが、蛍光プローブのカルボキシル基をアセトキシメチル (AM) 基によりエステル結合させて脂溶性とした AM 誘導体である。AM 誘導体そのものは無蛍光 (微弱蛍光) で、遊離イオンとは結合しない。細胞膜を透過しやすい特徴を有するので、AM 誘導体を溶解させた水溶液に細胞を加えると、AM 誘導体は細胞外のイオンと結合すること無しに細胞膜を透過して細胞内に入る。プローブ試薬が細胞内に入ると、AM 基は細胞内に存在しているエステラーゼの働きによって蛍光プローブから切り離され、遊離の Ca^{2+} との結合が可能となる (Fig.5-3)。また AM 基が切り離されることによって水溶性となるため、細胞膜を通過しにくくなり、細胞質内にとどまる。この AM 誘導体は水溶性が低いいため、細胞に導入する際には DMSO などに溶かし、適切な緩衝液に分散させ導入される。一般に水中での溶解度を高めるため Pluronic F127 などの低毒素の界面活性剤を同時に加えるケースが多い。

カルシウム蛍光プローブを選択する上で考慮する事柄として以下の(1)~(6)が重要であると考えられる。

- (1) 細胞毒性が無いこと。
- (2) 測定しようとする Ca^{2+} 濃度変化に比べて十分に速い反応速度を有すること。
- (3) に対する親和力 (K_d 値) が、生理的な値に近いこと。
- (4) 励起光が細胞に傷害を与えないこと。
- (5) 用いる測定装置の光路特性に試薬の励起波長および蛍光波長が合致していること。
- (6) 細胞内の他の金属イオン (Mg^{2+} 等) による妨害が少ないこと。

以上述べてきた事柄を考慮し、本研究では Fluo 3-AM をカルシウム蛍光プローブとして用いることにした。Fluo 3 は励起波長 506 nm、蛍光波長 526 nm といった蛍光特性を持つため、蛍光顕微鏡やフローサイトメーターにとって使いやすい。また、励起光による細胞の損傷、細胞由来の蛍光バックグラウンドなども軽減できる。Fluo 3 は Ca^{2+} 結合による蛍光強度の増加が大きく、約 40 倍にも達する。 Ca^{2+} 親和力は一般的によく用いられる Fura2 よりも若干弱いため、Fura2 よりも高いレベルの $\mu\text{mol/l}$ オーダーから低濃度にわたって Ca^{2+} 濃度を高感度にモニターできる。

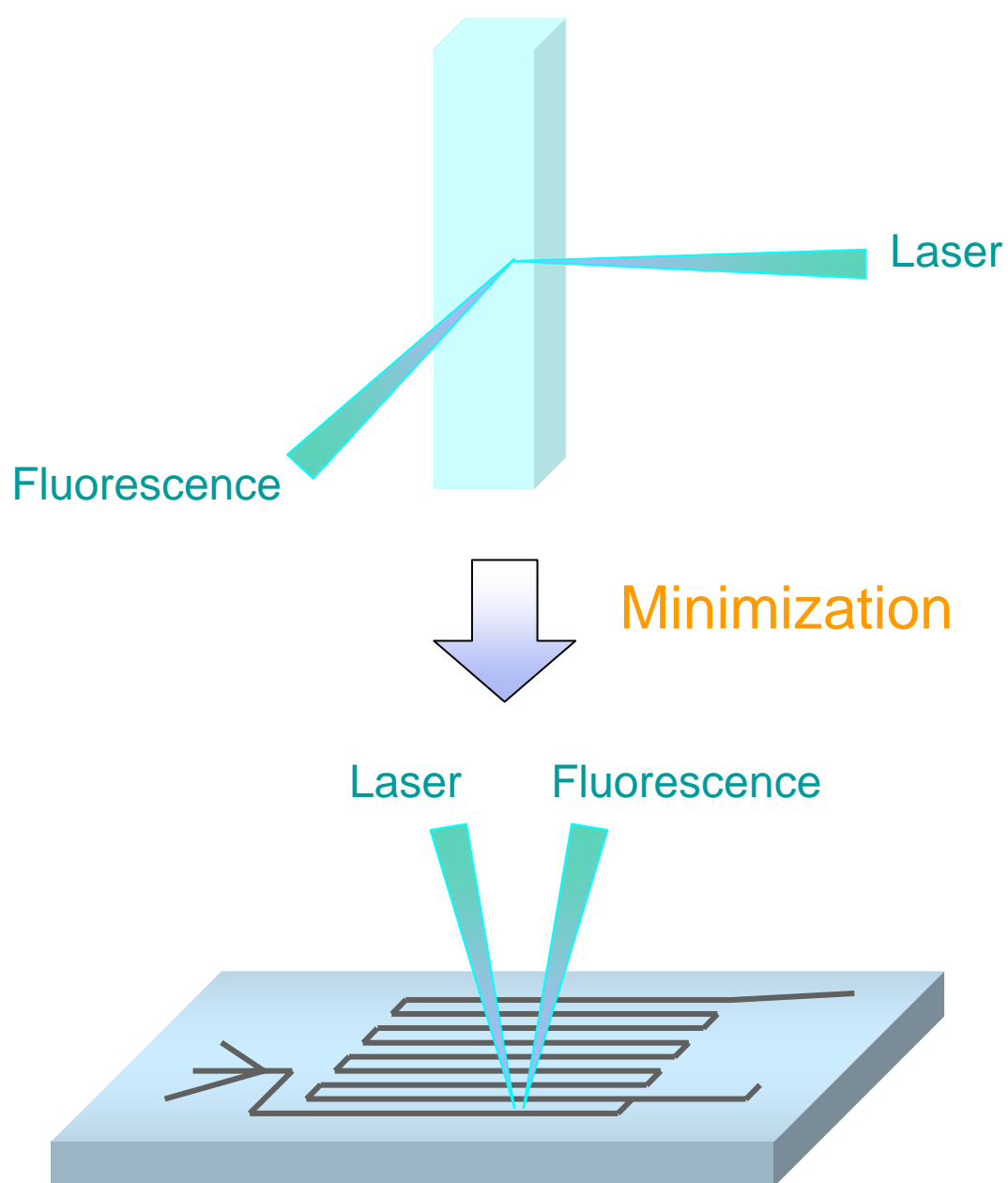


Fig. 5-1. Minimization using microreactor.

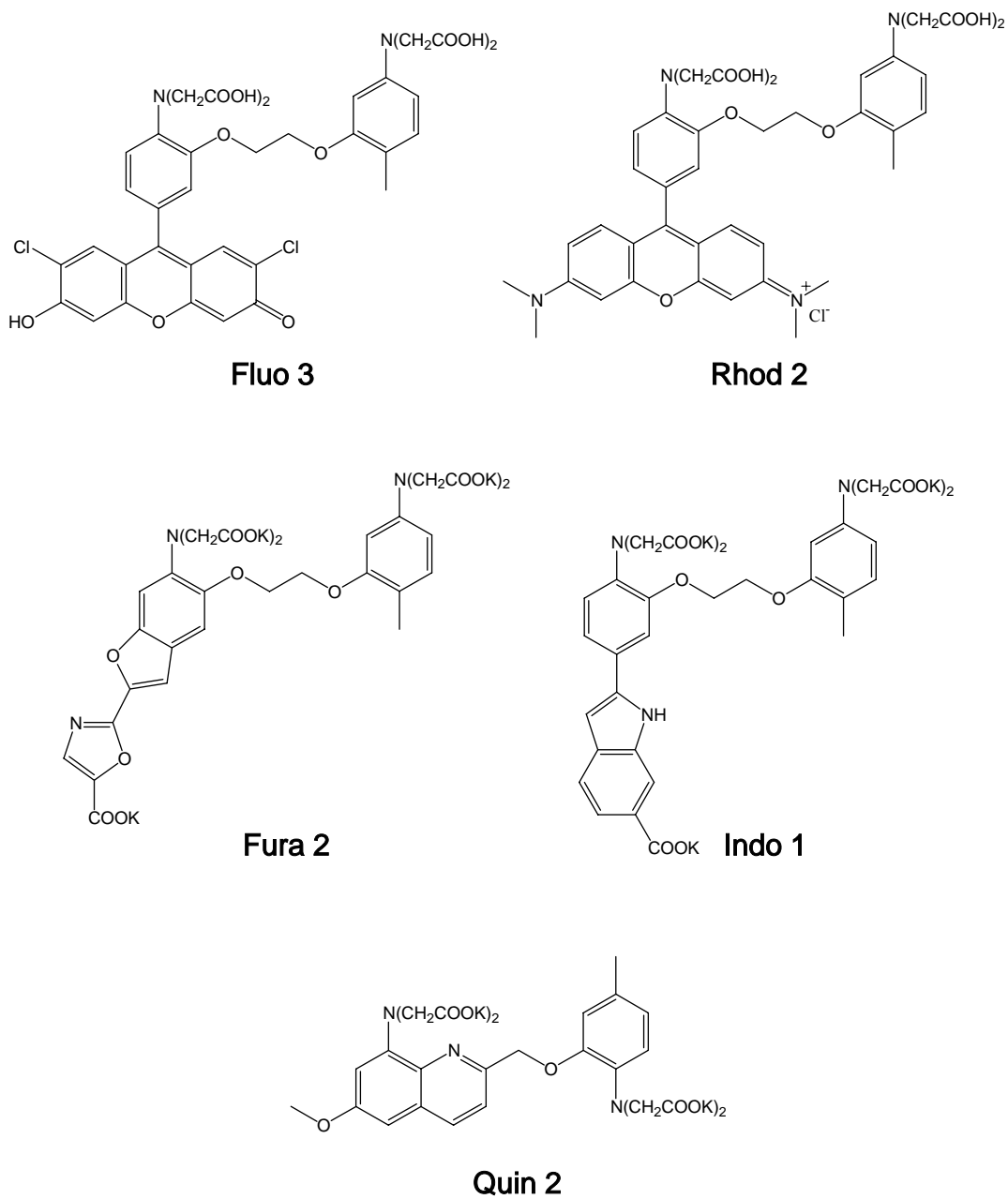


Fig. 5-2. Structure of calcium fluorescence probe.

Table 5-1. Characteristic of typical calcium fluorescence probe.

Compound	excitation (nm)	emission (nm)	K _d (nM)
High affinity			
calcium green1	506	531	190
calcium crimson	590	615	185
fluo 3	506	526	325
fluo 4	494	516	345
fura 2	340, 380	510	224
fura-PE3	340, 380	50	200
fura Red	436, 473	655-670	200
indo 1	330-346	401, 475	230
BAPTA-1	494	523	170
quin 2	332-352	492	126
rhod 2	533	576	570
Low affinity			
fluo 3FF	506-515	526	41
fluo 5N	491-493	515	90
mag-fura 5	330, 370	510	28
mag-indo 1	330-349	417, 476	35
rhod 5N	549-551	576	320

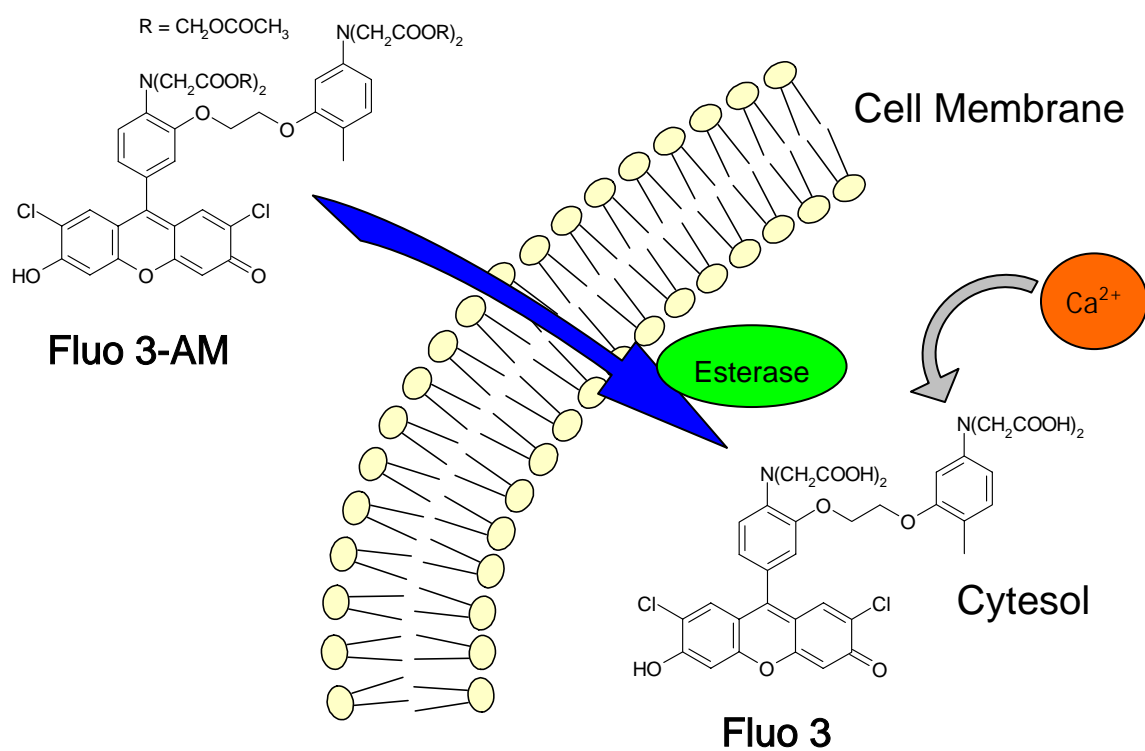


Fig. 5-3. Import of calcium fluorescence probe (Fluo3) into cytosol.

5-2. fMLP 刺激による FPR の活性化

本研究ではマイクロリアクター中にカルシウム蛍光プローブを取り込ませた好中球懸濁液をマイクロリアクター内に流通させ、fMLP 刺激による細胞内カルシウム濃度の増加を、カルシウム蛍光プローブを用いて測定し、この際の蛍光強度変化を FPR の活性化として評価した。また、マイクロリアクター内に好中球を流通させる際、通常の PBS などの緩衝液ではマイクロシリンジ内に好中球が沈殿してしまい、安定な送液が行えず、測定が困難になることが考えられたため、好中球の比重 1.085 に近い比重を持つ緩衝液に懸濁させて実験を行った。蛍光強度を測定する方法として蛍光光度計を用いる場合が多いが、本研究ではマイクロリアクターを使用するため、顕微分光装置を用いてリアクターの流路にレーザーを照射し、その際発せられる蛍光を検出装置にて測定した。測定波長は 195 ~ 956 nm (1 nm 間隔) で 515 nm のフィルターを用い、515 nm 以下の光をカットし蛍光強度を得た。各波長は 30 秒間隔で得られた蛍光強度を、11 回の積算を行った値を用いた。

顕微分光装置にはユージ企画 (有) 社 (Fukuoka, Japan) の分光測定顕微鏡システムを用いた (Fig. 5-4)。このシステムはレーザー光源部、顕微鏡部、検出部からなる。レーザー光源は Spectra-Physics Lasers 社 (Mountain View, CA, USA) のアルゴンレーザー (488 nm) 光源 (2017-02S)、顕微鏡はユージ企画 (有) 社の YKMRS01、検出部は光検出素子に電子冷却裏面入射型 CCD イメージセンサを備えた浜松ホトニクス (株) 社のマルチチャンネル検出器 PMA-11 (C7473) であり、リアクター流路の確認などのため顕微鏡上部にソニー (株) 社 (Tokyo, Japan) のデジタルビデオカメラ (DCR-TRV20) を用いた。シリンジからマイクロリアクターへの送液は、GL Sciences (株) 社 (Tokyo, Japan) のテフロンチューブ (外径 1/16", 内径 0.75 mm) によって連結された SUS 製のマイクロリアクターホルダーにセットし

たマイクロリアクターに、Bioanalytical system 社 (West Lafayette, IN, USA) のマイクシリンジコントローラによって制御して行った。シリンジにはテルモ (株) 社 (Tokyo, Japan) の SS-01T (1 ml) を用い、同社のシリンジ針 NN-2332R (内径 0.65 mm) を介して接続し、熱収縮チューブによって固定化した。

カルシウム蛍光プローブは同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan) から購入した Fluo 3-AM を用いた。好中球の刺激は Sigma 社から購入した fMLP を用いた。好中球および fMLP は Sigma 社の Histopaque-1083 (比重 1.083) に懸濁・溶解させて実験に用いた。実験手順を以下に示す。

実験手順

1. 第3章で述べた方法で好中球を単離し、 Ca^{2+} -free PBS に懸濁させた。
2. Fluo 3-AM を DMSO に溶解させ、終濃度 $10\ \mu\text{M}$ になるように好中球溶液に加えた。
3. 37°C で 30 分インキュベートし、Fluo 3 を好中球に取り込ませた。
4. 遠心分離した後、 Ca^{2+} -free PBS で 2 回洗浄した。
5. $1,500\ \text{rpm}$ で 5 分間遠心分離した後、Histopaque-1083 に懸濁させ、 $1 \times 10^7\ \text{cells/ml}$ の好中球溶液を調製した。この際、終濃度 $1\ \text{mM}$ になるように CaCl_2 溶液を好中球溶液に加えた。
6. 溶液をシリンジに充填し、マイクロリアクターに流通させ蛍光を測定した。

本研究では3種のリアクター (Flow 1 chip ~ Flow 3 chip) を用いて FPR の活性化を検討した。今回用いたマイクロリアクターの反応システムを Flow 3 chip を代表として Fig. 5-5 に示す。また、測定を行ったレーザー照射位置も同時に示す。

まず始めに測定を行った Flow 1 chip の結果を Fig. 5-6 に示す。Flow

1 chip は幅 400 μm 、深さ 200 μm のマイクロチャネルを持つ。この Flow 1 chip は 4 箇所の inlet を持つが、inlet 2 は本実験では使用せず、測定の際には Histopaque-1083 を充填して他の inlet からの逆流を防いでおいた。この Flow 1 chip に 10^7 cells/ml の好中球溶液、 10^{-6} M fMLP をインジェクトし（各 2 $\mu\text{l/min}$ (線速 2.5 cm/min)）蛍光強度変化を測定した。ブランクは inlet 4 から fMLP の代わりに Histopaque-1083 をインジェクトし、地点 A の部分での蛍光強度を測定した値を用いた。Flow 1 chip では、ブランクの蛍光強度と、fMLP 刺激を行った後の蛍光強度の明確な差は認められず、fMLP 刺激による細胞内カルシウム濃度の増加は引き起こされていないことが考えられた。流量を 2 $\mu\text{l/min}$ から 0.8 $\mu\text{l/min}$ (線速 1.0 cm/min) に減少させて実験を行っても、同様の結果が得られた。このような結果が得られた理由として、inlet 1 から流通させた好中球溶液と inlet 3 から流通させた Histopaque-1083 が層流で流れ、Flow 1 chip のマイクロチャネル内では “ fMLP | Histopaque-1083 | 好中球溶液 ” という流れとなり、全く活性化が引き起こされなかったとことが考えられた。そこでマイクロチャネルの流路幅を半減（400 μm → 200 μm ）させた Flow 2 chip をデザインし、作製を行った。

Flow 2 chip は Flow 1 chip と比較し、流路幅を半減させたほかに、ターン部分を矩形から曲線に変更し、fMLP の導入部分もストレートに入れるのではなく、曲線で導入できるように変更した。Flow 2 chip の結果を Fig. 5-7 に示す。この Flow 2 chip は Flow 1 chip と同様に inlet 1 から 10^7 cells/ml の好中球溶液を、inlet 3 から Histopaque-1083 を、inlet 4 から 10^{-6} M fMLP をインジェクトし、fMLP の代わりに Histopaque-1083 を流通させたときの地点 A での蛍光強度をブランクとした。各 inlet から流量 0.8 $\mu\text{l/min}$ (線速 2.0 cm/min) で好中球、fMLP を流通させたとき、Flow 1 chip の時と同様、ブランクの蛍光強度と、fMLP 刺激を行った後の蛍光強度の明確な差は認められなかった。また、流量を 0.8 $\mu\text{l/min}$ から 0.5 $\mu\text{l/min}$ (線速 1.25 cm/min)、0.2 $\mu\text{l/min}$ (線速 0.5 cm/min) に減少させたときも同様の結果が得られた。これらの

Flow 2 chip の結果は、Flow 1 chip の結果とかなり類似しており、好中球溶液と Histopaque-1083 の混合の不十分がこれらの結果を引き起こしたと考えられた。そこで十分な混合部を持つ Flow 3 chip をデザインし、作製を行った。

Flow 3 chip は Flow 2 chip と比較し、流路深さを半減 ($200\ \mu\text{m}$ \rightarrow $100\ \mu\text{m}$) させ、fMLP 刺激を行う前のターン部分を 1 から 4 ターンに増加させた。またこれに伴い、測定部分も大幅に増加させ、より長時間の刺激を検出できるようにマイクロチャネルをデザインした。Flow 3 chip の結果を Fig. 5-8 に示す。この Flow 3 chip は Flow 2 chip、Flow 1 chip と同様に inlet 1 から 10^7 cells/ml の好中球溶液を、inlet 3 から Histopaque-1083 を、inlet 4 から 10^{-6} M fMLP をインジェクトし、fMLP の代わりに Histopaque-1083 を流通させたときの各測定地点での蛍光強度をブランクとした。また、より大きな蛍光強度を得るため、顕微分光装置のシャッター速度を Flow 2 chip、Flow 1 chip の時の 19 msec から、700 msec に遅くした。これらの結果、各 inlet から流量 $0.2\ \mu\text{l}/\text{min}$ (線速 $1.0\ \text{cm}/\text{min}$) で好中球、fMLP を流通させたとき、fMLP 刺激による細胞内カルシウム濃度の増加が観測できた。最大の蛍光強度は fMLP の導入直後の地点 A で得られた。その後、刺激時間が長くなるに従い、蛍光強度は徐々に減少していった。この地点 A は fMLP が導入された地点から約 5 mm 進んだ地点で、3 箇所の inlet から流量 $0.2\ \mu\text{l}/\text{min}$ (線速 $1.0\ \text{cm}/\text{min}$) でサンプルを導入しているため、流路内では 3 倍の $0.6\ \mu\text{l}/\text{min}$ (線速 $3.0\ \text{cm}/\text{min}$) で溶液が流れていると考えられる。このことから地点 A は 10sec の fMLP 刺激による地点だと見積もった。Flow 1 chip、Flow 2 chip、Flow 3 chip を比較すると好中球と Histopaque-1083 の混合部が短い Flow 1 chip、Flow 2 chip では全く FPR の活性化が引き起こされなかったため、マイクロチャネル構造のデザインはリアクターを用いる反応で、最も考慮すべき問題であると考えられる。

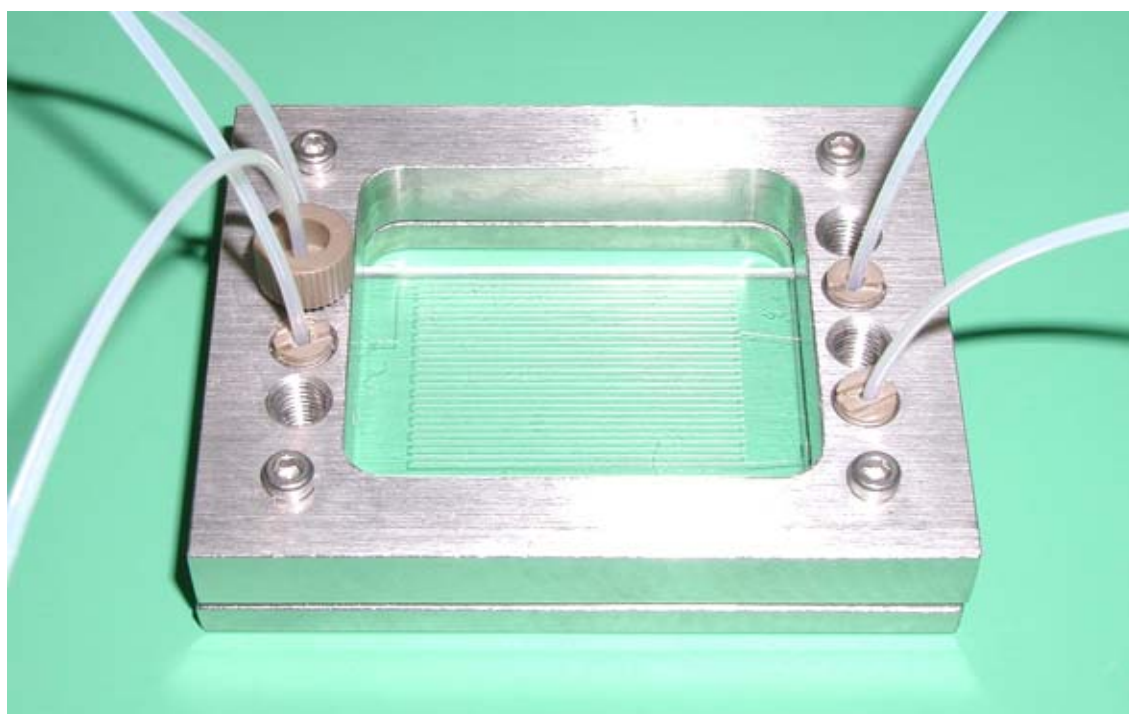
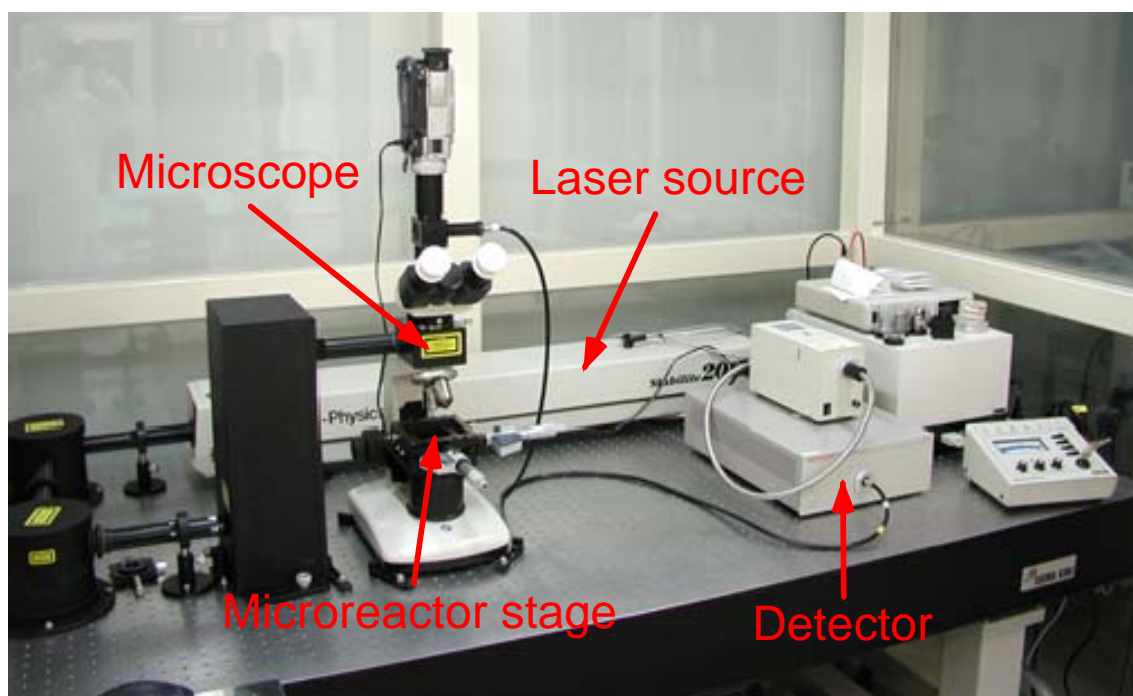


Fig. 5-4. Detecting system (top) and microreactor folder in this study (bottom).

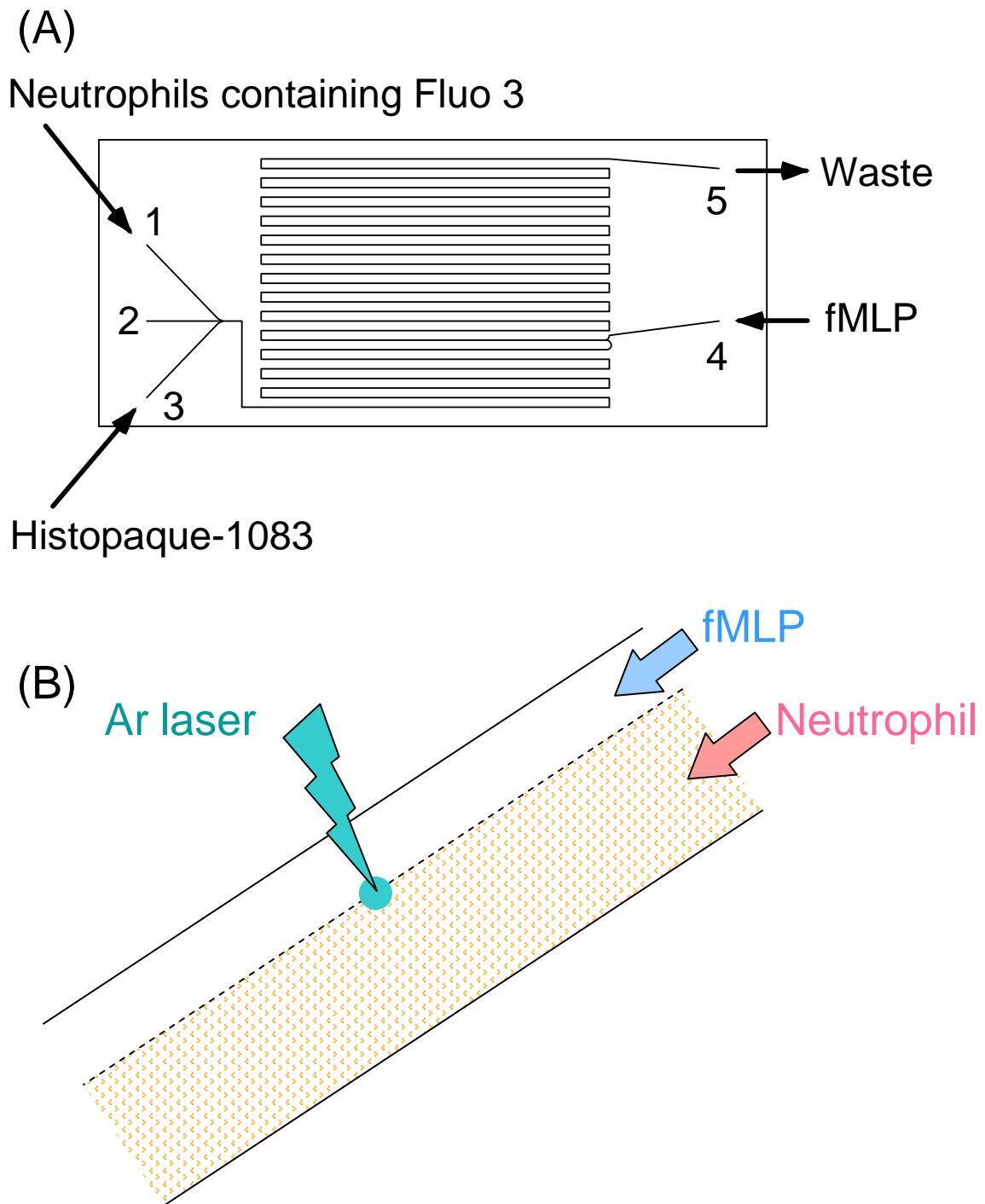


Fig. 5-5. The reaction system used Flow 3 chip (A) and position of laser irradiation (B). The inlet 1, 3 and 4 injected the neutrophil solution, Histopaque-1083 and fMLP, respectively. The inlet 2 charged Histopaque-1083, but this inlet was not used in this study. The outlet 5 was the waste.

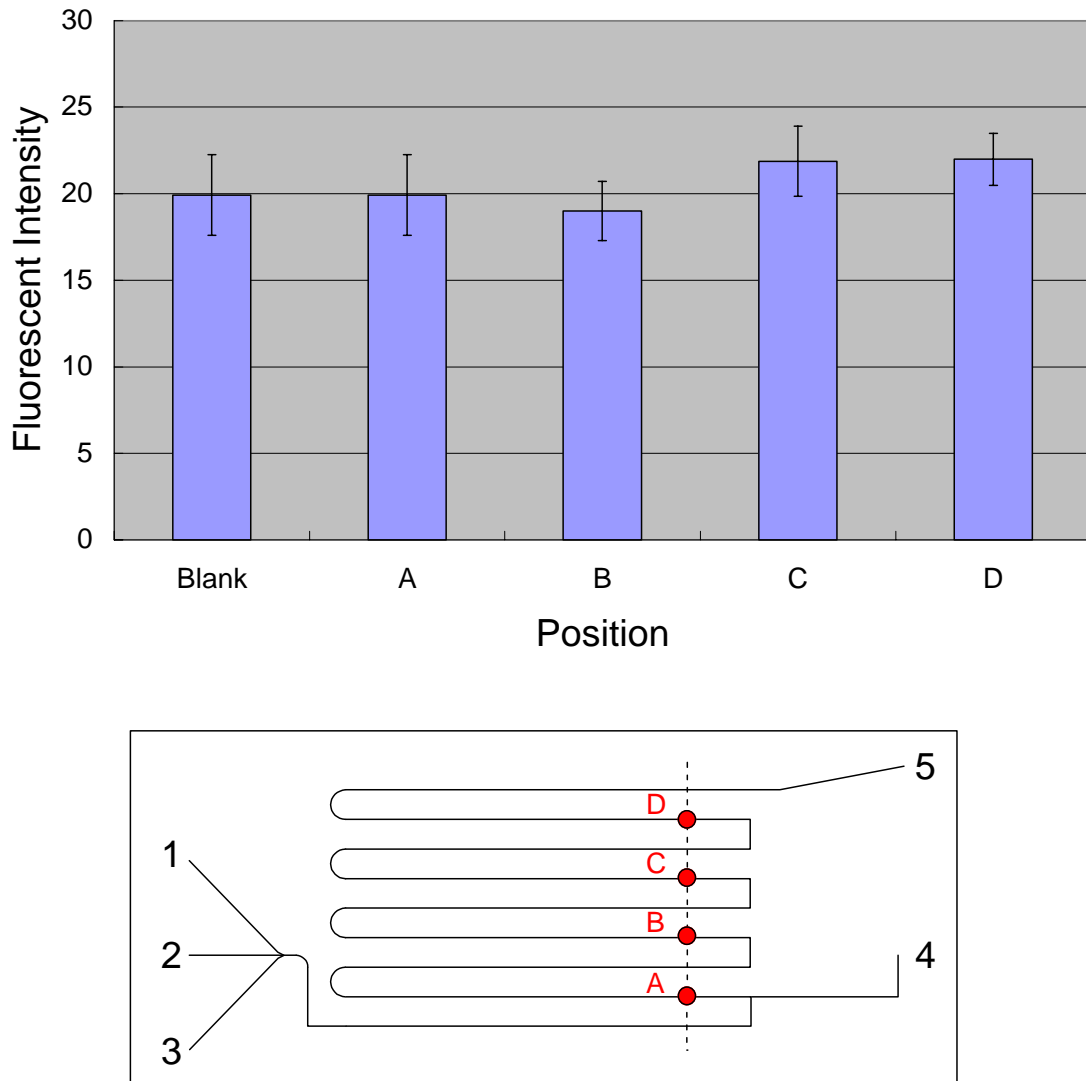


Fig. 5-6. Activation of FPR for fMLP stimulation used Flow 1 chip. Flow rate was 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ (2.5 cm/min) from inlet 1, 3, and 4. The inlet 1, 3 and 4 injected the neutrophil solution, Histopaque-1083, and fMLP, respectively. Injected neutrophils concentration was 10^7 cells/ml. Injected fMLP concentration was 10^{-6} M.

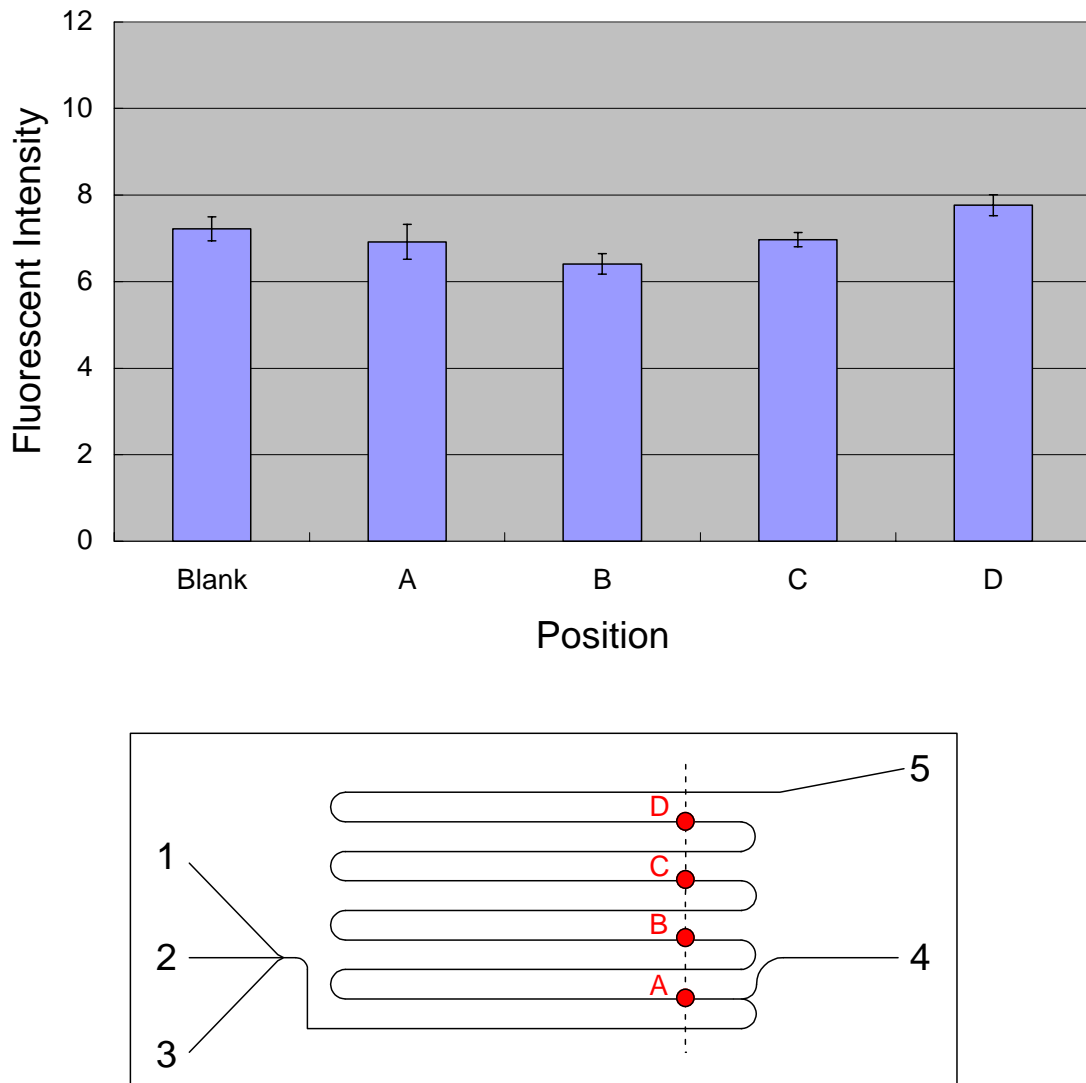


Fig. 5-7. Activation of FPR for fMLP stimulation used Flow 2 chip. Flow rate was 0.8 $\mu\text{l}/\text{min}$ (2.0 cm/min) from inlet 1, 3, and 4. The inlet 1, 3 and 4 injected the neutrophil solution, Histopaque-1083, and fMLP, respectively. Injected neutrophils concentration was 10^7 cells/ml. Injected fMLP concentration was 10^{-6} M.

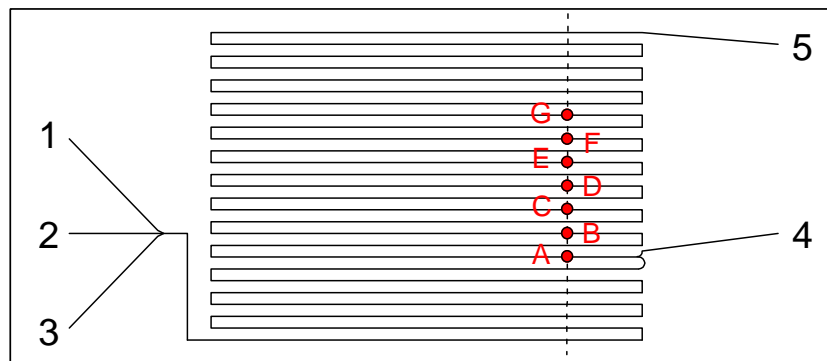
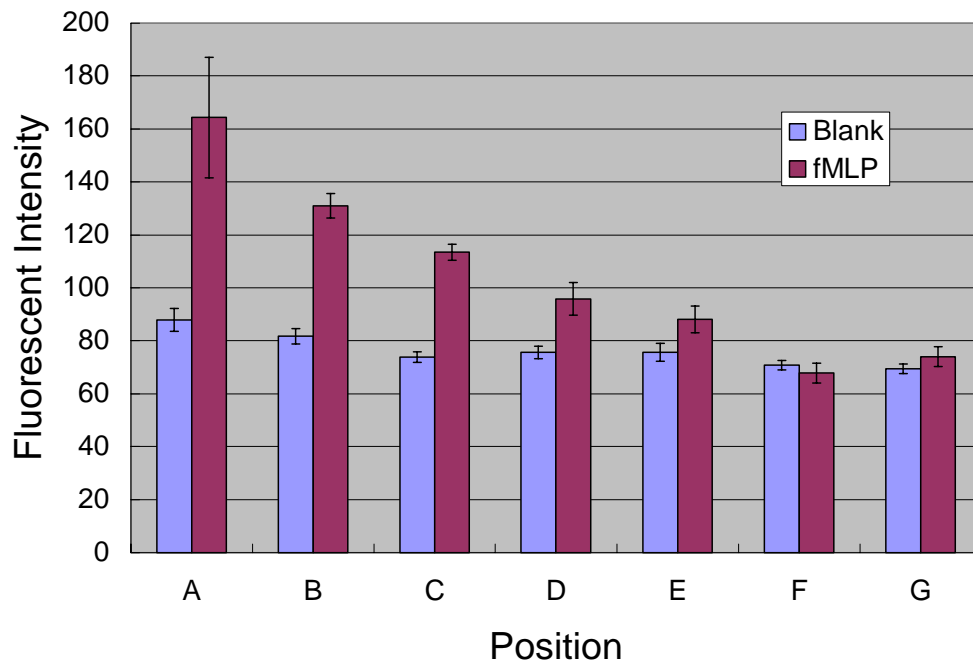


Fig. 5-8. Activation of FPR for fMLP stimulation used Flow 3 chip. Flow rate was 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ (1.0 cm/min) from inlet 1, 3, and 4. The inlet 1, 3 and 4 injected the neutrophil solution, Histopaque-1083, and fMLP, respectively. Injected neutrophils concentration was 10^7 cells/ml. Injected fMLP concentration was 10^{-6} M.

5-3. アンタゴニストによる FPR 活性化の阻害

5-3-1. fMLP のアンタゴニスト

実際の薬剤には受容体と相互作用し、その活性化を阻害することで薬剤効果を発揮するものが多い (Table 1-3.)。これらの化合物は受容体を活性化させる作動薬 (アゴニスト) に対し、アンタゴニスト (阻害剤) と呼ばれる。そこで本研究で開発したマイクロリアクターの適応範囲を広げるため、アンタゴニストによる FPR 活性化の阻害を行った。

過去、様々な構造活性相関研究により FPR のアンタゴニスト化合物が発見され、その機能が評価されている [7-14]。このアンタゴニスト化合物としては fMLP の N 端のホルミル基が、ウレタン型の benzyloxycarbonyl (Cbz) 基に置換された Cbz-Met-Leu-Phe、Boc 基に置換された Boc-Met-Leu-Phe やこれに類似した Boc-Nle-Leu-Phe、Leu-Phe 配列の繰り返しである Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe などが知られている。本研究では市販され、容易に入手できる Boc-Nle-Leu-Phe をアンタゴニストとして用いることにした。

5-3-2. バッチ反応

まず始めに、通常のパッチ式で Boc-Nle-Leu-Phe のアンタゴニスト活性を測定した。カルシウム蛍光プローブは同仁化学研究所から購入した Fluo 3-AM を用いた。好中球の刺激は Sigma 社から購入した fMLP を用いた。アンタゴニストの Boc-Nle-Leu-Phe は Sigma 社から購入したものを用了。蛍光測定に用いたセルは、アズワン (株) 社 (Osaka, Japan) から購入した 4 面透過型の PMMA 製のセルを用いた。蛍光は日本分光 (株) 社 (Tokyo, Japan) の FP-750 Spectrofluorometer で測定した。実験手順を以下に示す。

実験手順

1. 第3章で述べた方法で好中球を単離し、 Ca^{2+} -free PBS に懸濁させた。
2. Fluo 3-AM を DMSO に溶解させ、終濃度 $10\ \mu\text{M}$ になるように好中球溶液に加えた。
3. 37°C で 30 分インキュベートし、Fluo 3 を好中球に取り込ませた。
4. 遠心分離した後、 Ca^{2+} -free PBS で 2 回洗浄した。
5. $1,500\ \text{rpm}$ で 5 分間遠心分離した後、 Ca^{2+} -free PBS に懸濁させ、 $5 \times 10^6\ \text{cells/ml}$ の好中球溶液を調製した。
6. セルに好中球溶液 $1994\ \mu\text{l}$ 、 $1\ \text{M}\ \text{CaCl}_2$ $2\ \mu\text{l}$ 、Boc-Nle-Leu-Phe 溶液 $2\ \mu\text{l}$ 加え、10 分間インキュベートした。
7. 蛍光光度計にセルをセットし、測定を始めて 30 秒後に $10^{-6}\ \text{M}$ fMLP $2\ \mu\text{l}$ を加え、蛍光の経時変化を測定した。

測定条件は励起波長 $488\ \text{nm}$ (バンド幅 $5\ \text{nm}$)、蛍光波長 $526\ \text{nm}$ (バンド幅 $5\ \text{nm}$)、データ取り込み時間 $10\ \text{sec}$ 、測定時間 $150\ \text{sec}$ である。ブランクとしてアンタゴニストを加えないときの蛍光を測定した。実験結果を Fig. 5-9 に示す。また、Fig. 5-9 で得られた結果から、アンタゴニストの濃度ごとの蛍光の最大値を横軸に、最大の蛍光強度が得られた $10^{-9}\ \text{M}$ の最大蛍光強度を 1 とした時の相対蛍光強度を縦軸にプロットし直したグラフを Fig. 5-10 に示す。

また、アンタゴニストである Boc-Nle-Leu-Phe によって FPR が活性化されないことを確かめるために、fMLP 刺激を行わない場合の蛍光強度を評価した。実験操作は上記の操作 6 で Boc-Nle-Leu-Phe を加えずに、操作 7 で fMLP の代わりに Boc-Nle-Leu-Phe で好中球を刺激した。この結果を Fig. 5-11 に示す。

アンタゴニスト Boc-Nle-Leu-Phe による fMLP 刺激の抑制を検討したところ、アンタゴニスト濃度 $10^{-5}\ \text{M}$ で完全に活性化が抑制された。濃度 $10^{-6}\ \text{M}$ では、約 20 秒後に最大蛍光強度が得られたが、最大活性

の約半分程度に抑制された。濃度 $10^{-7} \sim 10^{-9}$ M の範囲では、約 20 秒後に最大蛍光強度が得られ、Boc-Nle-Leu-Phe による活性化の阻害はほとんど認められなかった。これらの最大蛍光強度を濃度ごとにプロットし直した結果、きれいなシグモイド曲線が得られた。このシグモイド曲線を元に、KaleidaGraph (Synaergy Software 社, Reading, PA, USA) から IC_{50} 値を求めたところ、 1.7×10^{-6} M であった。この IC_{50} 値は Boc-Met-Leu-Phe (6.4×10^{-7} M)、Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe (2.7×10^{-7} M) よりも一桁大きい、Cbz-Met-Leu-Phe (3.0×10^{-4} M) などよりも小さい。これらのことから Boc-Nle-Leu-Phe は比較的強いアンタゴニスト活性を有することが分かった。

また、Boc-Nle-Leu-Phe のパーシャルアゴニスト活性を検討したところ、測定を行った濃度 $10^{-5} \sim 10^{-9}$ M の範囲では、全く FPR の活性化は認められなかった。この結果は、Boc-Nle-Leu-Phe が完全アンタゴニスト化合物 (full antagonist) であることを示唆している。この Boc-Nle-Leu-Phe を使用することで、純粹に fMLP 刺激による活性化の抑制を評価できる。そのため、マイクロリアクター反応にもこの Boc-Nle-Leu-Phe をアンタゴニストとして使用することにした。

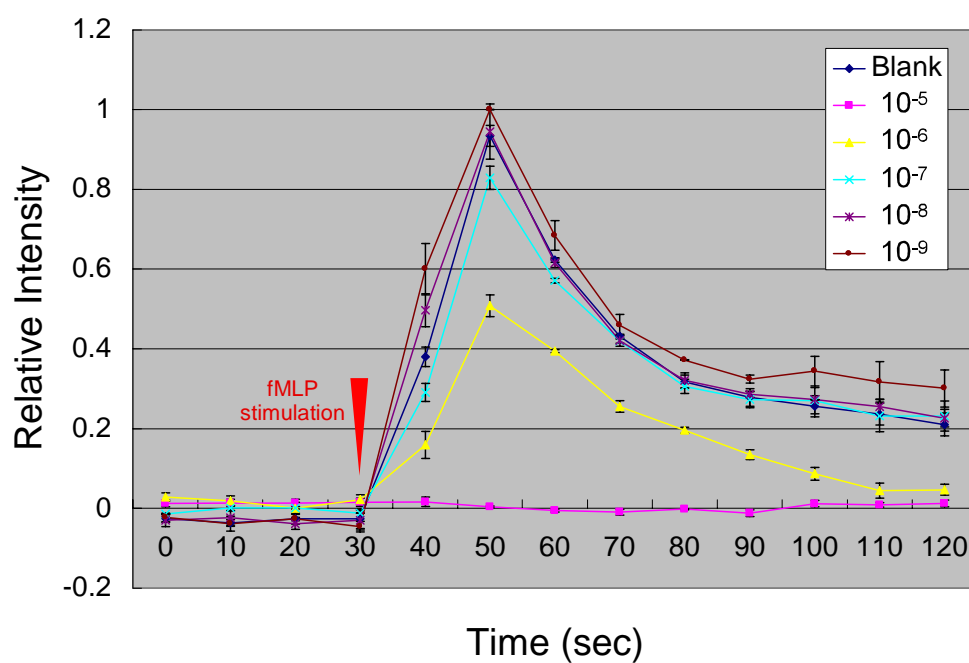


Fig. 5-9. Inhibition of FPR activation for antagonistic Boc-Nle-Leu-Phe in batchwise method.

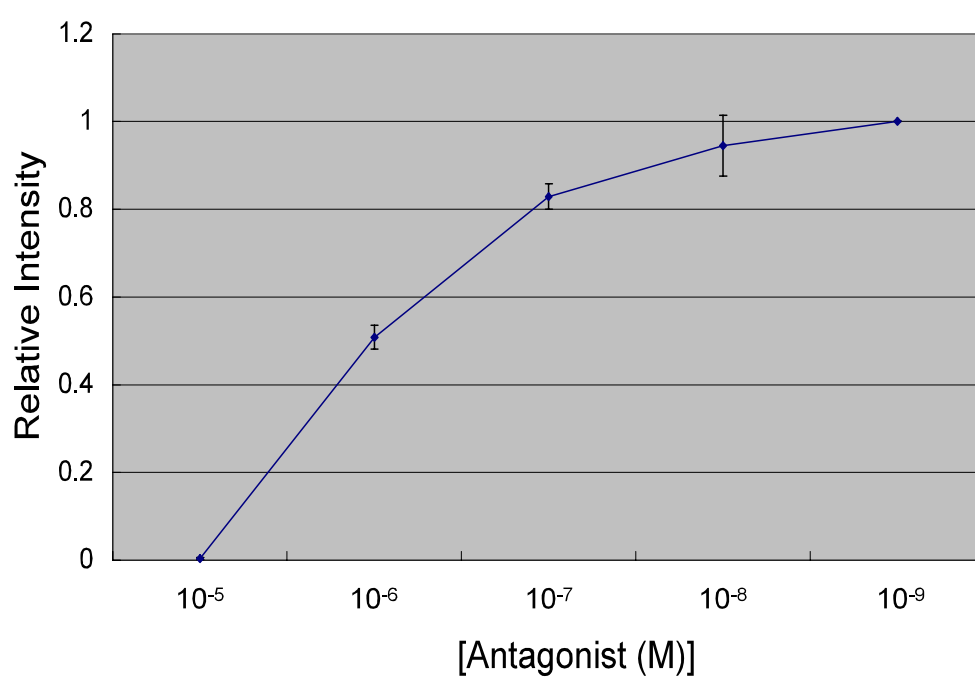


Fig. 5-10. Comparisons of Boc-Nle-Leu-Phe concentration.

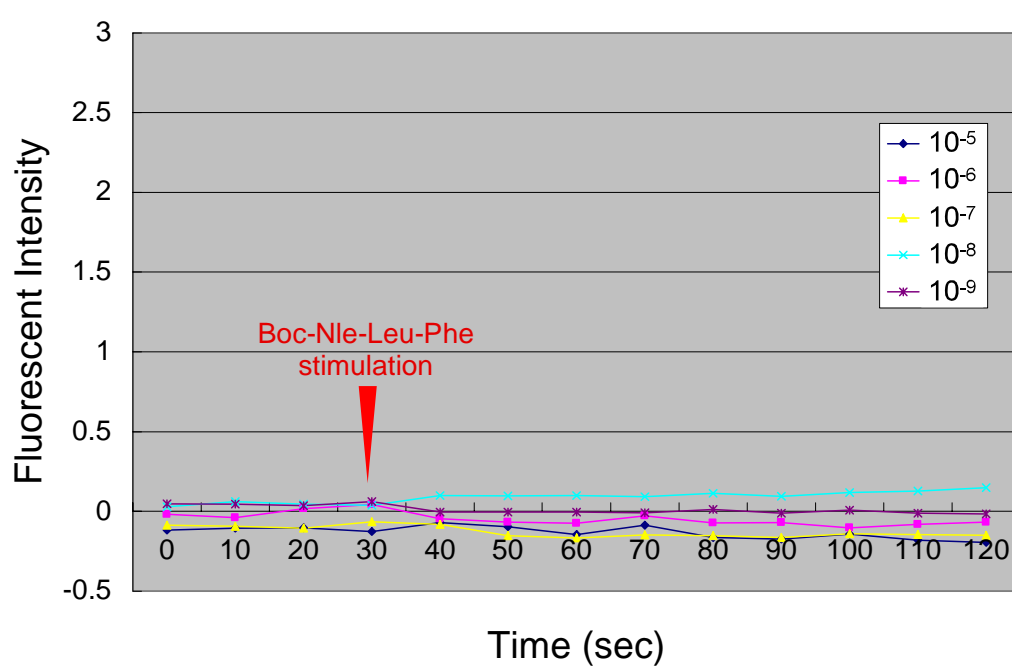


Fig. 5-11. Partial agonist activity of Boc-Nle-Leu-Phe.

5-3-3. マイクロリアクター反応

バッチ反応において Boc-Nle-Leu-Phe は完全なアンタゴニスト作用を示したため、この化合物をマイクロリアクター反応に用いて、FPR の活性化阻害を検討した。評価に用いたマイクロリアクターは活性化評価で唯一、活性化がうまく行えた Flow 3 chip を用いた。アンタゴニストの Boc-Nle-Leu-Phe は Sigma 社から購入したものをを用いた。この研究で用いた Flow 3 chip は活性化実験の時と同様に inlet 1 から 10^7 cells/ml の好中球溶液を、inlet 3 から Histopaque-1083 の代わりに 10^{-12} M Boc-Nle-Leu-Phe を、inlet 4 から 10^{-6} M fMLP をインジェクトし、fMLP、Boc-Nle-Leu-Phe の代わりに Histopaque-1083 を流通させたときの各測定地点での蛍光強度をブランクとした。

Flow 3 chip を用いた Boc-Nle-Leu-Phe による FPR 阻害の反応システムを Fig. 5-12 に、その結果を Fig. 5-13 に示す。まず始めにアンタゴニストである Boc-Nle-Leu-Phe を流通させずに、fMLP のみで FPR が活性化できるかどうかを検討した。各 inlet から流量 $0.2 \mu\text{l}/\text{min}$ (線速 $1.0 \text{ cm}/\text{min}$) で好中球、Histopaque-1083、fMLP を流通させた結果、得られた蛍光強度はブランクのそれと比較し、明らかに増加し、fMLP 刺激による細胞内カルシウム濃度の増加が引き起こされたことが確認できた。この結果は、単なる FPR 活性化だけを検討した Fig. 5-8 で示す結果と同様に、fMLP を流通させ始めてから約 5 mm の所である地点 A で最大強度が得られた。しかし、その蛍光強度の定常状態への減衰は Fig. 5-8 で示した 5 ターン目の地点 F ではなく、3 ターン目の地点 D であった。この理由として同一人物の好中球を用いているわけではないため、好中球の個人差によるものではないかと考えられるが、実際の所は不明である。しかしながら、地点 A では蛍光強度が明らかにブランクと比べ増加することが数度の実験からも確認され、このことは Flow 3 chip を用いた場合に必ず引き起こされる普遍的事実であることが考えられた。

次いで、inlet 1 から 10^7 cells/ml の好中球溶液を、inlet 3 から 10^{-12} M Boc-Nle-Leu-Phe を、inlet 4 から 10^{-6} M fMLP をインジェクトし

Boc-Nle-Leu-Phe による活性化の阻害について検討を行った。その結果、fMLP 導入直後の地点 A から測定を行った最終地点である地点 G まで、あらゆる混合時間帯で FPR の活性化阻害が確認された。この結果は、Flow 3 chip で改良した好中球と Boc-Nle-Leu-Phe の混合部が十分な長さを有していたため、fMLP 刺激を行う地点ではすでに FPR の活性化を抑制できていたことに起因すると考えられる。

また、マイクロリアクターを用いた場合の受容体の活性化の減衰時間はバッチ反応と比べると、比較的長いものであった。バッチ反応では約 1.5～2 分で基底のレベルまで減衰するが、今回のマイクロリアクター反応では 2 ターン折り返した地点 C まで基底状態に減衰することはなかった。この地点 C は fMLP を導入地点から 15.5 cm 離れた場所であり、3 つの入り口から各線速 1.0 cm/min (トータル 3.0 cm/min) で流体を流しているため、混合時間 5 分の地点であると見積もることができる。この活性化持続時間の差異は、マイクロリアクター反応の場合、fMLP 刺激を行う地点ではまた完全な混合ができておらず、その後徐々に混合していくため、絶えず活性化されていない FPR と fMLP が反応していたと考えられる。

最後に今回用いた Flow 3 chip は細胞溶液と緩衝液あるいは阻害物質(アンタゴニスト)を溶かした溶液の混合に計 4 ターン用いられ、その後活性化物質(作動薬、アゴニスト)をインジェクトし、これらの活性化、あるいは阻害効果を測定する部分に計 9.5 ターンの流路を有する。しかしながら今回の結果から、活性化物質を流通させた直後の地点 A で最大の細胞応答が得られることが判明しており、この測定部分は 9.5 ターンも必要とせず、1 ターンあれば十分に受容体の活性化を評価できると考えられる。このようなことを考慮し、マイクロリアクターの最適化を行えば、測定時間の短縮、測定に用いるサンプルや廃液量の更なる微少化、ひいては実験にかかるコストの減少につながると期待される。

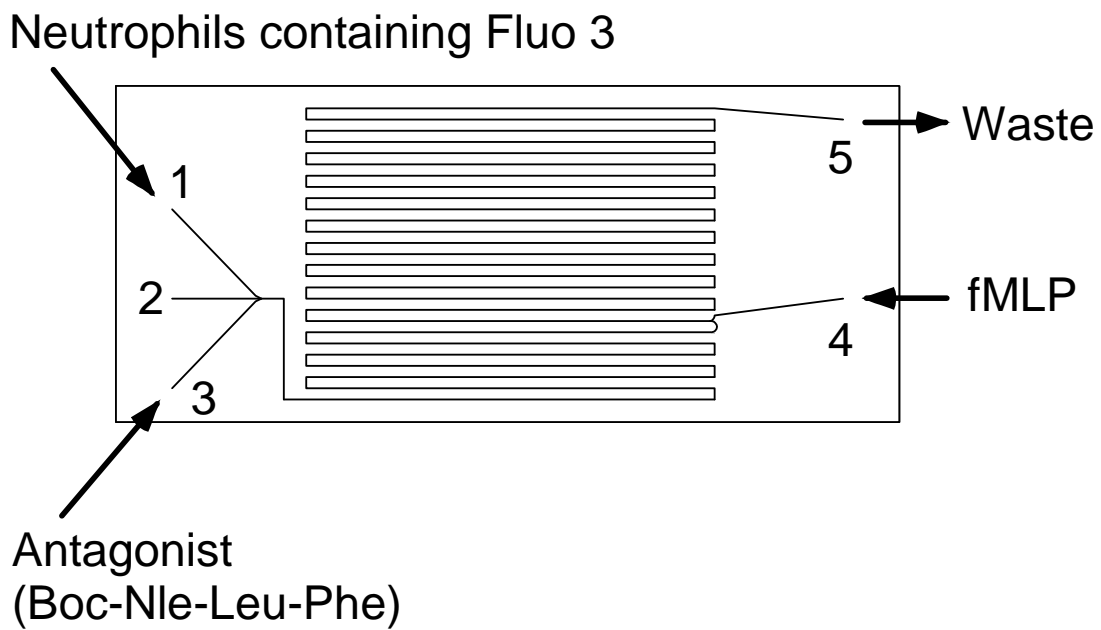


Fig. 5-12. The reaction system used Flow 3 chip. The inlet 1, 3 and 4 injected the neutrophil solution, Boc-Nle-Leu-Phe and fMLP, respectively. The inlet 2 charged Histopaque-1083, but this inlet was not used in this study. The outlet 5 was the waste.

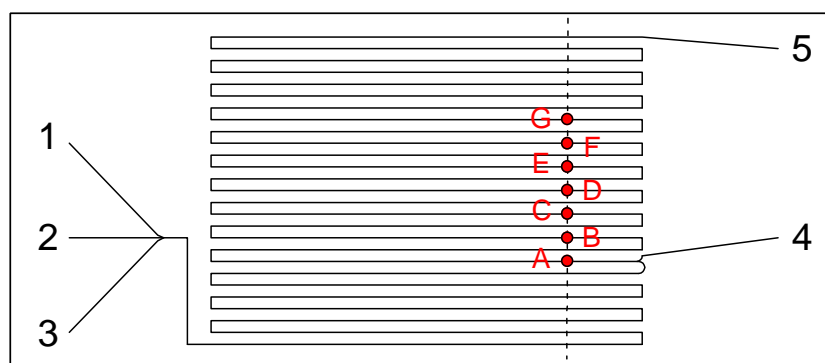
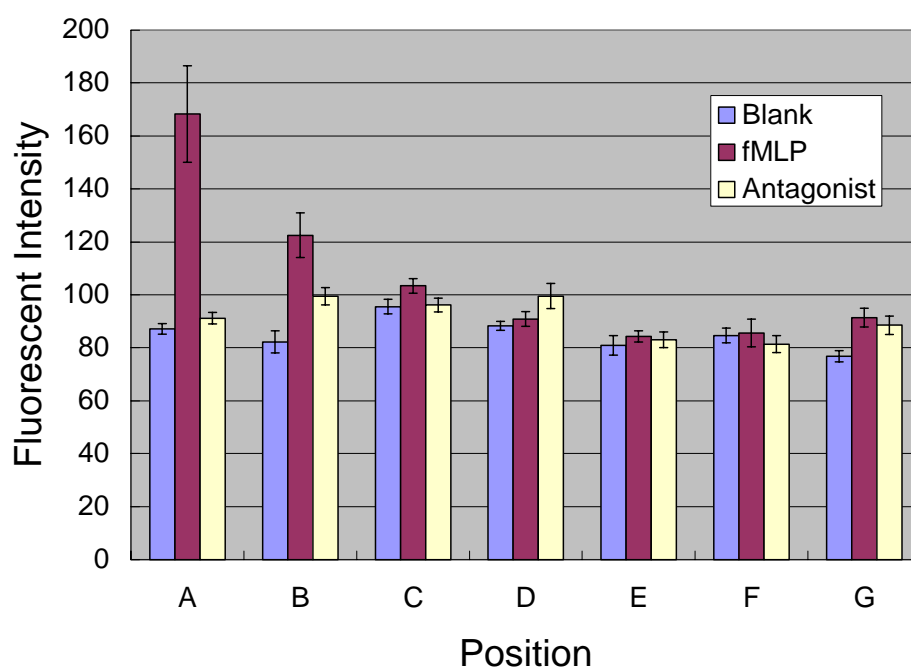


Fig. 5-13. Inhibition of FPR activation for antagonistic Boc-Nle-Leu-Phe. Flow rate was 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ (1.0 cm/min) from inlet 1, 3, and 4. The inlet 1, 3 and 4 injected the neutrophil solution, Boc-Nle-Leu-Phe, and fMLP, respectively. Injected neutrophils concentration was 10^7 cells/ml. Injected fMLP concentration was 10^{-6} M. Injected Boc-Nle-Leu-Phe concentration was 10^{-12} M.

5-4. 参考文献

- [1] Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440-3450.
- [2] Minta, A., Kao, J.P.Y. and Tsien, R.Y. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 8171-8178.
- [3] Tscharaner, V.V., Deranleau, D.A. and Baggiolini, M. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 10163-10168.
- [4] Hallett, M.B., Hodges, R., Cadman, M., Blanchfield, H., Dewitt, S., Pettit, E.J., Laffafian, I. and Davies, E.V. (1999) *J. Immunol. Methods*, **232**, 77-88.
- [5] Adams, S.R., Kao, J.P.Y. and Tsien, R.Y. (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 7957-7968.
- [6] Saavedra-Molina, A., Uribe, S. and Devlin, T.M. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **167**, 148-153.
- [7] Marasco, W.A., Showell, H.J., Freer, R.J. and Bercker, E.L. (1982) *J. Immunol.*, **128**, 956-962.
- [8] Wenzel-Seifert, K. and Seifert, R. (1993) *J. Immunol.*, **150**, 4591-4599.
- [9] Liang, T.S., Gao, J.-L., Fatemi, O., Lavigne, M., Leto, T.L. and Murphy, P.M. (2001) *J. Immunol.*, **167**, 6609-6614.
- [10] Korchak, H.M., Wilken, C., Rich, A.M., Radin, A.R., Vienne, K. and Rutherford, L.E. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 7439-7445.
- [11] Freer, R.J., Day, A.R., Radding, J.A., Schiffmann, E., Aswanikumar, S., Showell, H.J. and Becker, E.L. (1980) *Biochemistry*, **19**, 2404-2410.
- [12] Schiffmann, E., Aswanikumar, S., Venkatasubramanian, K., Corcoran, B.A., Pert, C.B., Brown, J., Gross, E., Day, A.R., Freer, R.J., Showell, A.H. and Berker, E.L. (1980) *FEBS Lett.*, **117**, 1-7.
- [13] Toniolo, C., Crisma, M., Moretto, V., Freer, R.J. and Becker, E.L.

(1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1034**, 67-72.

[14] Freer, R.J., Day, A.R., Becker, E.L., Showell, H.J., Schiffmann, E. and Gross, E. (1979) Gross, E. and Meienhofer, J., ed., Structure and Biological Function, *Proc. Sixth American Peptide Symposium*, **749**, 749-751.

第6章

Conclusion

まとめ

本研究は、薬剤と標的受容体の相互作用機構の解析方法検討し、簡便な薬剤検索システムの開発を目指して研究を行った。この6章ではそれぞれについてのまとめを行う。

6-1. 薬剤と受容体の相互作用機構の解析方法

まず始めに受容体との相互作用機構の解析方法として、本研究で標的にしたホルミルペプチド受容体に作用させるリガンドペプチドである、一連の2箇所の標識（光アフィニティー標識、ビオチンタグ）を行ったfMLPアナログをデザイン、合成した。光アフィニティー標識はFPRとこれらのアナログを光架橋によって共有結合で連結させるために導入し、ビオチンタグは光架橋によって形成されたFPR-fMLPアナログ複合体を検出する際の標識として導入した。これらの一連のfMLPアナログを用いて、生理活性を測定し、光照射によってFPRと光架橋させ、FPRの検出を試みた(Table 6-1)。その結果、

1. Ahx スペースの短い[Bpa⁴,Ahx₀]-fMLP、[Bpa⁴,Ahx₁]-fMLP アナログでは、今回測定した遊走活性、活性酸素産生能を示さなかった。
2. 光アフィニティープローブである Bpa の位置を変化させた [Bpa⁴,Ahx₂]-fMLP、[Bpa²,Ahx₂]-fMLP を比較すると、4 位に Bpa を導入した [Bpa⁴, Ahx₂]-fMLP は遊走活性、活性酸素産生能の両方の活性を示した。一方、2 位に導入した [Bpa², Ahx₂]-fMLP は活性酸素産生能のみ示した。
3. 光架橋実験において、生理活性を示さなかった [Bpa⁴,Ahx₀]-fMLP、[Bpa⁴,Ahx₁]-fMLP は FPR との複合体を形成せず、FPR のバンドは検出できなかった。

4. [Bpa⁴,Ahx₂]-fMLP、[Bpa²,Ahx₂]-fMLP は FPR との複合体のバンドが検出され、このバンドは光架橋の際、fMLP を共存させるとその濃度に依存してバンドの濃さ(光架橋された FPR 量)が変化した。

これらの結果から、本研究で用いた一連の fMLP アナログを用いる FPR の活性発現には少なくとも 2 つの Ahx スペーサーが必要であることが考えられた。近年の fMLP アナログを用いた研究では細胞遊走能を示さず、活性酸素産生能のみ示すアナログが多数発見されている。この活性酸素放出能のみ示すものには、Cavicchioni らによって報告されている For-Met-Xaa-Phe-OMe (Xaa: Ser, Ser(Bzl), Cys, Cys(Bzl), Tyr, Tyr(Bzl), Lys, Lys(Z))や[1], [2]、2 位の Leu 残基の位置を Leu, Aib, Pro からなる dipeptide で置換したアナログや[3]、2 位にヒドロキシル基やアミノ基など反応性側鎖を導入させた di-tripeptide タイプの For-Met-Xaa(For-Met-Leu-Phe)-Phe-OMe (Xaa: Ser, Lys) [4]、Torrini らによって報告されている For-Thp-Ac₆c-Phe-OMe[5]、Ferretti らによって報告されている For-Met-Δ^ZLeu-Phe-OMe などが挙げられる[6]。これらのアナログは共通して 2 位の Leu 残基を立体障害の大きな bulky なアミノ酸に置換した例が多い (Fig. 6-1)。これらの結果を裏付けるように、2 位に Bpa 残基を導入した[Bpa²,Ahx₂]-fMLP は細胞遊走能を示さず、活性酸素産生能を示した。これらのことから、fMLP アナログの 2 位の位置にかさ高い Bpa 残基を導入することによって、どの生理活性を示すかを選択できる可能性を持つことが考えられた。

ビオチンとアビジンの相互作用を利用した光架橋された FPR の検出からは、生理活性を有し、適切な標識を行ったアナログを用いることによって、標的受容体の検出を行えることが示された。アビジン - ビオチンの相互作用は生化学研究で用いられている反応である[7]。このアビジンは卵白由来のタンパク質で、ビオチンとは高い親

和力 ($K_a \approx 10^{15} \text{ M}^{-1}$) で結合する。また、このアビジンと同様に *streptomyces avidinii* 由来のストレプトアビジンもアビジンと同等の親和力でビオチンと相互作用するが、アビジンよりも他のタンパク質に対する非特異的な相互作用が少ないという利点がある。このアビジン類は 8 つの β ストランド構造を持ち、この β ストランド構造が樽状にならぶ β -barrel 構造を取っている [8]。アビジン類とビオチンの相互作用機構はよく研究され、アビジンだと Asn¹², Ser¹⁶, Tyr³³, Thr³⁵, Thr³⁸, Ala³⁹, Thr⁴⁰, Trp⁷⁰, Phe⁷², Ser⁷³, Ser⁷⁵, Thr⁷⁷, Phe⁷⁹, Trp⁷⁹, Asp¹¹⁸ が、ストレプトアビジンだと Asn²³, Ser²⁷, Tyr⁴³, Ser⁴⁵, Asn⁴⁹, Ser⁸⁸, Thr⁹⁰, Trp⁹², Trp¹⁰⁸, Asp¹²⁸ がビオチンとの相互作用に関与していると判明している [8-11]。ビオチンとアビジンの相互作用システムは以上述べてきたようによく研究されている上、かなり強い結合力を有するため、Bpa などの光アフィニティーラベルを用いた光架橋実験と組み合わせることで、薬物 - 標的受容体の相互作用形式を解明するための有用な解析方法となりうると期待される。

Table 6-1. Results of biological activity and detection of cross-linked FPR.

fMLP analog	Chemotaxis	O ₂ ⁻ production	Cross-linking
[Bpa ⁴ ,Ahx ₀]-fMLP	×	×	×
[Bpa ⁴ ,Ahx ₁]-fMLP	×	×	×
[Bpa ⁴ ,Ahx ₂]-fMLP			
[Bpa ² ,Ahx ₂]-fMLP	×		

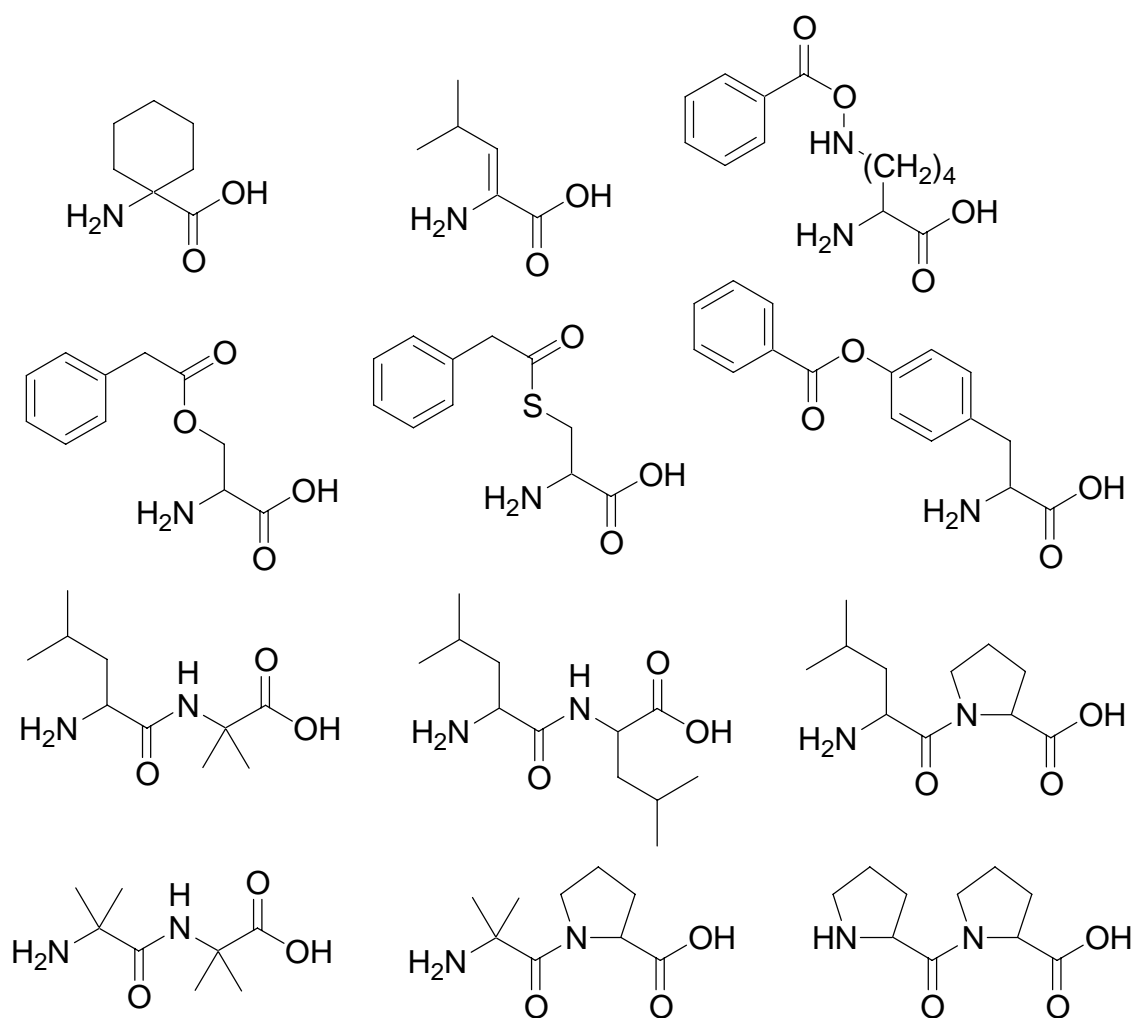


Fig. 6-1. Bulky amino acid (peptide) in superoxide selective fMLP analogs.

6-2. 薬剤の検索装置の開発

簡便な薬剤検索システムの開発としてマイクロリアクターを用いた FPR の活性化について検討した。この研究ではサンプルを流す流路の幅、深さ、活性化物質である fMLP を導入する条件を変化させた 3 種類のマイクロリアクターを用いて実験を行った。これらの結果、

1. 好中球と Histopaque-1083 の混合部が短い Flow 1 chip、Flow 2 chip では全く FPR の活性化が引き起こされなかった。
2. 好中球と Histopaque-1083 の混合部が短く、流路幅、深さが小さい Flow 3 chip では、受容体の活性化が引き起こされた。
3. Flow 3 chip を用いた、FPR の活性化阻害ではバッチ反応と同様に fMLP 刺激を阻害することができた。

これらの Flow 1 chip、Flow 2 chip、Flow 3 chip の結果を比較すると、好中球と Histopaque-1083 の混合部が短い Flow 1 chip、Flow 2 chip では全く FPR の活性化が引き起こされなかったため、マイクロチャネル構造のデザインはリアクターを用いる反応で、最も考慮すべき問題であると考えられる。また、バッチ反応において、Boc-Nle-Leu-Phe は比較的強い阻害能 (IC_{50} 値 1.7×10^{-6} M) を持つことが判明した。この Boc-Nle-Leu-Phe と Flow 3 chip を用いた阻害実験の結果から、バッチ反応に比べ微量の試薬で同様の実験を行えることが判明した。また、マイクロリアクターを用いた場合の受容体の活性化の減衰時間はバッチ反応と比べると、比較的長いものであった。この結果は、マイクロ流路に特有の層流に起因する減少だと考えられた。現在、薬剤スクリーニングに用いられているものは主に 96, 384 ウェルマイクロプレートであり、これらのマイクロプ

レートに比べ、本研究で用いたマイクロリアクターは希釈濃度のばらつきによる分注精度の問題、解放系のため溶液の蒸発、ウェル間の液跳ねなどによる精度の問題などを克服する利点があると考えられる。

本研究で成功を収めた Flow 3 chip にはまだ無駄な部分があるため、マイクロリアクターの最適化を行えば、測定時間の短縮、測定に用いるサンプルや廃液量の更なる微少化、ひいては実験にかかるコストの減少につながると期待される。以上のことから、本研究では従来から存在する高価で大型な装置を用いる必要のない、小型で安価で迅速に薬剤のスクリーニングに応用できる装置の開発に成功したと考えている。

6-3. まとめ

本研究は莫大な費用・時間がかかり、多段階のステップを必要とする新薬開発をする上で、最も時間短縮が可能である探索研究の段階に焦点を当てて研究を行ったものである。探索研究の段階は物質創製研究、スクリーニング、構造機能解析の段階からなる。物質の創製研究は、現在数多くの薬剤候補化合物がコンビナトリアル合成によって産生されている。そのため、製薬企業ではこれらの多数の化合物ライブラリーから薬理効果を持つ化合物を発見するスクリーニングに精力が注がれている。多数の薬剤候補化合物を迅速にスクリーニングする方法としては、専用のスクリーニング装置が用いられることが多い。このスクリーニング装置としては浜松ホトニクス（株）のFDSSシリーズなどが市販されている。この装置は96, 384ウェルマイクロプレートでスクリーニングを行う装置であり、細胞内イオン測定や膜電位測定などが可能である。しかし、これらのスクリーニング装置はスクリーニングに特化されているため、他の研究への応用が難しく、装置の導入コストも非常にかかると言った欠点を持つ。そのため、研究室レベルでこれらの薬剤スクリーニングに応用できる技術を研究する際には、より安価で、汎用性の高い装置を使って簡便に研究できる装置が望まれる。本研究で用いたマイクロリアクターは、研究室レベルでは一枚一枚の大きさが小さいため、省スペースで安価に研究でき、実用化する際にはマイクロリアクターの集積・積層化によって一枚あたりの反応を容易にスケールアップできると期待される。

これらのマイクロリアクターを用いて発見された薬剤候補化合物を使い、より高効率な薬剤を開発する上で、薬剤と標的受容体の相互作用を解析する必要性がある。本研究で用いた2つの標識を用いた薬剤-受容体の相互作用解析方法は、標的受容体のアミノ酸配列が判明している場合、薬剤が受容体のどこに作用しているかが容易

に判断できる可能性を秘めている。この結合部位の詳細な構造と薬剤の薬理作用が判明すれば、より薬理効果が高く副作用を引き起こしにくい薬剤の開発が可能となる。

以上の事柄から本研究の研究成果は、薬剤と標的受容体の相互作用機構の解析方法に応用でき、また、製薬業界に求められている低コストで、多種類微量な薬剤候補化合物から薬剤を開発するハイスループット技術に大いに貢献でき、新薬の開発に大きな知見をもたらすものと期待される。

6-4. 参考文献

- [1] Cavicchioni, G., Turchetti, M. and Spisani, S. (2002) *J. Pept. Res.*, **60**, 223-231.
- [2] Cavicchioni, G. and Spisani, S. (2001) *J. Pept. Res.*, **58**, 257-262.
- [3] Cavicchioni, G., Varani, K., Niccoli, S., Rizzuti, O. and Spisani, S. (1999) *J. Pept. Res.*, **54**, 336-343.
- [4] Cavicchioni, G., Turchetti, M. and Spisani, S. (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 3157-3159.
- [5] Torrini, I., Zecchini, G.P., Paradisi, M.P., Lucente, G., Mastropietro, G., Gavuzzo, E., Mazza, F., Pochetti, G., Traniello, S. and Spisani, S. (1996) *Biopolymers*, **39**, 327-337.
- [6] Ferretti, M.E., Nalli, M., Biondi, C., Colamussi, M.L., Pavan, B., Traniello, S. and Spisani, S. (2001) *Cell. Signal.*, **13**, 233-240.
- [7] Wilchek, M. and Bayer, E.A. (1988) *Anal. Biochem.*, **171**, 1-32.
- [8] Livnah, O., Bayer, E.A., Wilchek, M. and Sussman, J.L. (1993) *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5076-5080.
- [9] Katz, B.A. and Cass, R.T. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 13220-13228.
- [10] Hassan Qureshi, M., Yeung, J.C., Wu, S.-C. and Wong, S.-L. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 46422-46428.
- [11] Pazy, Y., Kulik, T., Bayer, E.A., Wilchek, M. and Livnah, O. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 30892-30900.

略 号

Ahx	ε -aminohexanoic acid
AM	acetoxymethyl
BIS	<i>N,N'</i> -methylenebisacrylamide
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
Bpa	<i>p</i> -benzoylphenylalanine
BPB	bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
CBB	coomassie brilliant blue G-250
DIPCI	diisopropylcarbodiimide
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
EDT	1, 2-ethanedithiol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
Fluo 3	1-[2-amino-5-(2,7-dichloro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
fMLP	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
For	formyl
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl
FPR	formyl-peptide receptor
FPRL1	formyl-peptide receptor like 1
FPRL2	formyl-peptide receptor like 2
GPCR	G-protein-coupled receptor
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase

HTS	high-throughput screening
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
MALDI-TOF MS	matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry
MBHA	4-methylbenzhydrylamine
MeOH	methanol
Nle	norleucine
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidone
PBS	phosphate buffered saline
PI	protease inhibitor
PMMA	poly (methyl methacrylate)
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PVDF	poly (vinylidene fluoride)
SDS	sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBS-T	tris buffered saline containing Tween 20
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethylenediamine
TFA	trifluoroacetic acid
TFMSA	trifluoromethanesulfonic acid
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane

アミノ酸およびその誘導体の略号は IUPAC-IUB Joint Commission, *Eur. J. Biochem.*, **138**, 9 (1984)による生化学的命名法に従って用いた。また、すべての光学活性のアミノ酸は、特に指示しない限り L 体を示している。

Appendix 1: G-code program of Flow 1 Chip.

O0320;	G01X12.5Y-19.0;	G01Z-#500F20;
G91G00G28Z0M5;	G00Z1.0;	G01X14.0Y-19.0F100;
G40G49G80;	;	G02X15.0Y-20.0R1.0;
M6T9;	G00X5.0Y-27.0;	G01X15.0Y-25.0;
G90G00G55X5.0Y-11.0;	G01Z-0.08F20;	X52.5;
G43Z10.0H9M3S15000;	G01X12.5Y-19.25;	Y-22.5;
M8;	G01X13.0Y-19.0;	X18.215;
M98P321;	G00Z1.0;	G02X18.215Y-20.0R1.25;
;	;	G01X52.5Y-20.0;
G91G00G28Z0M5;	G00X65.0Y-19.0;	Y-17.5;
G40G49G80;	G01Z-0.08F20;	X18.215;
M6T11;	G01X65.0Y-22.5;	G02X18.215Y-15.0R1.25;
G90G00G55X5.0Y-11.0;	X52.5;	G01X52.5Y-15.0;
G43Z10.0H11M3S12000;	G00Z1.0;	Y-12.5;
M8;	;	X18.215;
M98P322;	G00X5.0Y-19.0;	G02X18.215Y-10.0R1.25;
;	M99;	G01X52.5Y-10.0;
G00Z10.0M9;	%	Y-7.5;
G91G00G28Z0M5;		X18.215;
G49;		G02X18.215Y-5.0R1.25;
G90G00G59X0Y0;	O0322;	G01X55.0Y-5.0;
M30;	#500=0.025;	G01X65.0Y-3.0
%	N1;	G00Z1.0;
	IF[#500GT0.1]GOTO2;	;
	M98P323;	G00X5.0Y-19.0;
	#500=#500+0.1;	M99;
	GOTO1;	%
	N2;	
	M99;	
	%	
O0321;		
G90G00Z1.0;		
G90G00X5.0Y-11.0;		
G01Z-0.08F20;		
G01X12.5Y-18.75;		
G01X13.0Y-19.0;		
G00Z1.0;		
;		
G00X5.0Y-19.0;		
G01Z-0.08F20;		
	O0323;	
	G90G00Z1.0;	
	G90G00X12.5Y-19.0;	

T9: 400 μm drill

T11: 200 μm drill

Appendix 2: G-code program of Flow 2 Chip.

O0315;	G90G00G59X0Y0;	G02X18.215Y-5.0R1.25;
G91G00G28Z0M5;	M30;	G01X55.0Y-5.0;
G40G49G80;	%	G01X65.0Y-3.0
M6T11;		G00Z1.0;
G90G00G55X5.0Y-11.0;		;
G43Z10.0H11M3S12000;	O0316;	G00X5.0Y-11.0;
M8;	#500=0.025;	G01Z-#500F20;
M98P316;	N1;	G01X12.5Y-18.6;
;	IF[#500GT0.1]GOTO2;	G01X13.0Y-19.0;
G91G00G28Z0M5;	M98P317;	G00Z1.0;
G40G49G80;	#500=#500+0.025;	;
M6T9;	GOTO1;	G00X5.0Y-19.0;
G90G00G55X5.0Y-11.0;	N2;	G01Z-#500F20;
G43Z10.0H9M3S12000;	M99;	G01X12.5Y-19.0;
M8;	%	G00Z1.0;
;		;
G00Z1.0;		G00X5.0Y-27.0;
G01Z-1.1F20;	O0317;	G01Z-#500F20;
G00Z1.0;	G90G00Z1.0;	G01X12.5Y-19.4;
;	G90G00X12.5Y-19.0;	G01X13.0Y-19.0;
G01X5.0Y-19.0F100;	G01Z-#500F20;	G00Z1.0;
G01Z-1.1F20;	G01X14.0Y-19.0F100;	;
G00Z1.0;	G02X15.0Y-20.0R1.0;	G00X65.0Y-19.0;
;	G01X15.0Y-25.0;	G01Z-#500F20;
G01X5.0Y-27.0F100;	X51.785;	G01X55.285Y-19.0;
G01Z-1.1F20;	G03X51.785Y-22.5R1.25;	G03X53.035Y-21.25R2.25;
G00Z1.0;	G01X18.215Y-22.5;	G02X51.785Y-22.5R1.25;
;	G02X18.215Y-20.0R1.25;	G00Z1.0;
G01X65.0Y-3.0F100;	G01X51.785Y-20.0;	;
G01Z-1.1F20;	G03X51.785Y-17.5R1.25;	G00X5.0Y-19.0;
G00Z1.0;	G01X18.215Y-17.5;	M99;
;	G02X18.215Y-15.0R1.25;	%
G01X65.0Y-19.0F100;	G01X51.785Y-15.0;	
G01Z-1.1F20;	G03X51.785Y-12.5R1.25;	
G00Z1.0;	G01X18.215Y-12.5;	
;	G02X18.215Y-10.0R1.25;	
G00Z10.0M9;	G01X51.785Y-10.0;	
G91G00G28Z0M5;	G03X51.785Y-7.5R1.25;	
G49;	G01X18.215Y-7.5;	

T11: 200 μm drill

T9: 700 μm drill

Appendix 3: G-code program of Flow 3 Chip.

O0305;	G90G00G59X0Y0;	X17.0;	
G91G00G28Z0M5;	M30;	Y-16.0;	O0308;
G40G49G80;	%	X53.5;	#500=0.025;
M6T11;		Y-15.0;	N1;
G90G00G55X5.0Y-11.0;		X17.0;	IF[#500GT0.1]GOTO2;
G43Z10.0H11M3S12000;	O0306;	;	M98P309;
M8;	#500=0.025;	Y-14.0;	#500=#500+0.025;
M98P306;	N1;	X53.5;	GOTO1;
;	IF[#500GT0.1]GOTO2;	Y-13.0;	N2;
G91G00G28Z0M5;	M98P307;	X17.0;	M99;
G40G49G80;	#500=#500+0.025;	Y-12.0;	%
M6T10;	GOTO1;	X53.5;	
G90G00G55X5.0Y-11.0;	N2;	Y-11.0;	O0309;
G43Z10.0H10M3S15000;	M99;	X17.0;	G90G00Z1.0;
M8;	%	Y-10.0;	G90G00X5.0Y-11.0;
M98P308;		X53.5;	G01Z-#500F20;
;		;	G01X12.5Y-18.75;
G91G00G28Z0M5;	O0307;	Y-9.0;	G01X13.0Y-19.0;
G40G49G80;	G90G00Z1.0;	X17.0;	G00Z1.0;
M6T9;	G90G00X12.5Y-19.0;	Y-8.0;	;
G90G00G55X5.0Y-11.0;	G01Z-#500F20;	X53.5;	G00X5.0Y-19.0;
G43Z10.0H9M3S12000;	G01X15.0Y-19.0F100;	Y-7.0;	G01Z-#500F20;
M8;	Y-28.0;	X17.0;	G01X12.5Y-19.0;
;	X53.5;	Y-6.0;	G00Z1.0;
G00Z1.0;	Y-27.0;	X53.5;	;
G01Z-1.1F20;	X17.0;	Y-5.0;	G00X5.0Y-27.0;
G00Z1.0;	Y-26.0;	X17.0;	G01Z-#500F20;
;	X53.5;	;	G01X12.5Y-19.25;
G01X5.0Y-19.0F100;	Y-25.0;	Y-4.0;	G01X13.0Y-19.0;
G01Z-1.1F20;	X17.0;	X53.5;	G00Z1.0;
G00Z1.0;	;	Y-3.0;	;
;	Y-24.0;	X17.0;	G00X5.0Y-19.0;
G01X5.0Y-27.0F100;	X53.5;	Y-2.0;	M99;
G01Z-1.1F20;	Y-23.0;	X53.5;	%
G00Z1.0;	X17.0;	G01X65.0Y-3.0	
;	Y-22.0;	G00Z1.0;	
G01X65.0Y-3.0F100;	X53.215;	;	
G01Z-1.1F20;	G03X53.215Y-21.0R0.5	G90G00X65.0Y-19.0;	
G00Z1.0;	G01X17.0Y-21.0;	G01Z-#500F20;	
;	Y-20.0;	G01X53.5Y-20.5F100;	T11: 200 μm drill
G01X65.0Y-19.0F100;	X53.5;	G02X53.215Y-21.0R0.5	T10: 100 μm drill
G01Z-1.1F20;	;	G00Z1.0	T9: 700 μm drill
G00Z1.0;	Y-19.0;	;	
;	X17.0;	G00X5.0Y-19.0;	
G00Z10.0M9;	Y-18.0;	M99;	
G91G00G28Z0M5;	X53.5;	%	
G49;	Y-17.0;		

謝 辞

博士課程で本研究を行うに当たり、多くの方々にご指導・ご協力を頂きました。博士号取得に当たり産業技術総合研究所九州センターの主査の安田 誠二 九州センター所長代理 兼 産学官連携コーディネータ、副査のマイクロ空間化学研究ラボの宮崎 真佐也 主任研究員、佐賀大学理工学部の兒玉 浩明 助教授、花本 猛士 助教授には大変お世話になり、この場をお借りし深く感謝の意を表します。また、博士後期課程進学時に指導教官をしてくださいました西九州大学健康栄養学科の近藤 道男 学科長(佐賀大学理工学部前学部長)には大変お世話になり、深く感謝の意を表します。また、日々の研究生活を行うに当たり、産業技術総合研究所九州センター マイクロ空間化学研究ラボの清水 肇 九州センター所長 兼 ラボ長、前田 英明 副ラボ長、井上 耕三 主任研究員、中村 浩之 主任研究員、山口佳子 研究員、山下 健一 研究員、アジア理科器からの派遣研究員である金丸 茂 様には大変お世話になり、深く感謝の意を表します。また、生理活性測定において様々な支援をしてくださいました佐賀医科大学の浜崎 雄平 教授、藤田 一郎 様に深く感謝の意を表します。また、佐賀大学での研究生活で様々なご指導、ご助言を頂きました佐賀大学理工学部の長田 聡史 助手に深く感謝の意を表します。

学部4年間、修士課程2年間、博士後期課程3年間に、様々な知識を与えてくださった佐賀大学の諸先生方には、深く感謝の意を表します。また、本研究にご協力いただきました佐賀大学の吉木 政弘様には、深く感謝の意を表します。また、産業技術総合研究所九州センターでの研究生活において、様々な議論を交わしていただいた荻野 和也 様、駒田 彰 様には、深く感謝の意を表します。また、計6年間の研究生活で様々な実験指導、実験補助をしてくださいました佐賀大学の近藤研究室、兒玉研究室、産業技術総合研究所マイ

クロ空間化学研究ラボの皆様には大変お世話になり、深く感謝の意を表します。

また、本研究で使用する血液を採血して頂きました産業技術総合研究所九州センターの山口 典子 様、ならびに血液を提供いただきましたボランティアの方々には、深く感謝の意を表します。

また、大学生生活において様々な情報を提供して下さい、親しく付き合ってくださいました岡山県倉敷市役所の小池 和雄 様、大阪大学大学院の後藤 雅秀 様、岩尾磁器工業(株)の杉山 聡 様には、深く感謝の意を表します。

また、過酷な博士論文作成に耐えてくれた NEC 製のノートパソコン Lavie G(型番 PC-LG10NRX57, モバイル Athlon4 (1 GHz), 384 MB, HDD 30 GB, CD-RW/DVD-ROM 搭載)、ならびに自作パソコン 1 号機 (Pentium4 (2A GHz), DRDRAM 1 GB, HDD 60+40 GB, CD-ROM&DVD-ROM&CD-R/RW(3 台)(計 5 台)) には深く感謝いたします。

最後に、長い間の学生生活で、様々な御心配・御迷惑をおかけしながらも温かく見守り、そして多大なる御理解と御尽力を賜りました御両親、ならびに御家族の方々、博士課程の途中でお亡くなりになり天国より温かく見守って下さった祖母には、切に深く感謝の意を表します。

2003 年 3 月 蒔江光邦